

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Studijní obor: Farmacie



PRŮNIK NANOČÁSTIC SUBLINGVÁLNÍ MEMBRÁNOU 1

**PERMEATION OF NANOPARTICLES ACROSS SUBLINGUAL
MEMBRANE 1**

Diplomová práce

Autor: Martina Spurná
Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavel Berka

Hradec Králové, květen 2012

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při vypracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Martina Spurná

Tímto bych chtěla poděkovat panu Mgr. Pavlovi Berkovi za cenné rady, odborné vedení, zájem a ochotu při realizaci této práce. Poděkování patří taktéž mé spolužačce a kamarádce Pavlíně Dvořákové, která se mnou spolupracovala.

ABSTRAKT

Teoretická část pojednává o problematice absorpce léčiv přes sliznici dutiny ústní. Dutina ústní byla popsána jak z hlediska anatomického a fyziologického, tak z hlediska vlivu jejich vlastností na absorpci léčiv.

Dále se zabývá nanotechnologií jako možností podání léčiv. Charakterizuje nanočástice, jejich vlastnosti a výhody či nevýhody podávání léčiv prostřednictvím nanočástic.

Závěr této části patří charakterizaci použitých metod v experimentální části.

V experimentální části jsou zhodnoceny výsledky permeací prováděných na prasečí sublingvální (podjazykové) membráně *in vitro*. V těchto permeačních pokusech byl sledován průnik nanočástic značených Chromeonem 470 různě zpracovanými sublingválními membránami (1 cm²), jak čerstvými, tak hodinu zmraženými, v obou případech zakonzervovanými azidem sodným.

Permeačním pokusům předcházela charakterizace velikosti nanočástic pomocí DLS (dynamický rozptyl světla) a pozorování nanočástic pod fluorescenčním mikroskopem.

U membrány zakonzervované azidem sodným a na hodinu zmražené byl pozorován lepší průnik nanočástic, než u membrány, která zmražena nebyla.

Klíčová slova: Anatomie a fyziologie dutiny ústní, sublingvální podání léčiv, sublingvální permeace, nanotechnologie, nanočástice.

ABSTRACT

Theoretical part discusses matters of drug absorption through mucosa of oral cavity. Oral cavity was described from both anatomical and physiological aspects and effects of their own properties on drug absorption.

Further it deals with nanotechnology as a possibility for drug administration. It characterises nanoparticles, their properties and advantages/disadvantages in drug administration via nanoparticles.

Closure of this part belongs to characterization of methods used in experimental part.

In experimental part the results of permeation experiments conducted on porcine sublingual membrane *in vitro* are evaluated. In these permeation experiments the penetration of Chromeon 470 marked nanoparticles through variously treated sublingual membrane (1 cm²) was observed. Either fresh membranes or membranes frozen for 1 hour were used, in both cases preserved by sodium azide.

Permeability experiments were preceded by nanoparticle size characterization using DLS (dynamic light scattering) and with observation of nanoparticles using fluorescent microscopy.

Better nanoparticle permeation was observed in sodium azide preserved frozen membranes than in membranes that were not frozen.

Keywords: Anatomy and physiology of oral cavity, sublingual drug administration, sublingual permeation, nanotechnology, nanoparticles.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	ZADÁNÍ PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Bukální/sublingvální podání.....	10
3.1.1	Požadavky pro podání léčiva skrz dutinu ústní	11
3.2	Anatomie a fyziologie dutiny ústní.....	11
3.3	Prostup léčiv biologickými membránami	14
3.4	Cesty absorpce léčiva přes sliznici dutiny ústní	16
3.5	Absorpce léčiv přes sliznici dutiny ústní	17
3.6	Fyziologické bariéry absorpce léčiv přes sliznici dutiny ústní.....	18
3.6.1	Propustnost sliznice dutiny ústní	19
3.6.2	Sliny a hlen ^{7, 11, 21}	20
3.7	Nanotechnologie a nanočástice	22
3.7.1	Nanomateriály	23
3.7.2	Nanotechnologie jako řešení pro podávání léků	24
3.7.3	Nevýhody použití nanočástic v terapii	24
3.8	Nanotoxikologie	25
3.9	Fyzikální a chemická stabilita nanočásticových léčiv	25
3.9.1	Vliv lékové formy na stabilitu	26
3.9.2	Možné stabilitní problémy nanosuspenzí	26
3.9.3	Chemická stabilita.....	29
3.9.4	Další otázky týkajících se stability velkých biomolekul	29
3.9.5	Charakterizace stability nanočástic léčiva a nanočástic v lékové formě	30
3.10	Výhody podávání léčiv prostřednictvím nanočástic	31
3.11	Klinicky užívané nanodisperze.....	32
3.12	Nanočástice značené fluorescenčním barvivem Chromeon 470 (PD-Chromeon 470)	32
3.13	Fluorimetrie	33
3.14	Fluorescenční mikroskopie.....	34
3.15	DLS ^{37, 38, 39}	36
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	Suroviny a materiál	39
4.2	Přístroje	40
4.3	Pomůcky.....	41
4.4	Biologický materiál.....	41
4.5	Měření velikosti nanočástic v disperzi pomocí DLS	42

4.6	Pozorování nanočástic pomocí fluorescenčního mikroskopu	42
4.7	Měření pH disperze nanočástic.....	42
4.8	Příprava pufrů	43
4.8.1	Fosfátový pufr dle Sørensenova pH 6,6 (500ml).....	43
4.8.2	Fosfátový pufr dle Sørensenova pH 7,4 (1000ml).....	44
4.9	Permeační pokusy	44
4.10	Příprava kalibračních vzorků.....	45
4.11	Měření kalibračních vzorků a odebrané akceptorové fáze z permeačních pokusů	45
4.12	Pozorování vzorků ve fluorescenčním mikroskopu.....	46
5	DOKUMENTACE ⁴⁴	47
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	59
6.1	pH disperze nanočástic.....	59
6.2	Distribuce velikostí částic zjištěná metodou DLS	59
6.3	Pozorování nanočástic pomocí fluorescenčního mikroskopu	63
6.4	Elektrický odpor membrán v permeačním pokusu	66
6.5	Kalibrační přímky	68
6.6	Vyhodnocení permeačního pokusu.....	69
6.7	Pozorování vzorků z permeačního experimentu pomocí fluorescenční mikroskopie	72
7	ZÁVĚRY	77
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	80
9	ZDROJE	82

1 ÚVOD

Nanotechnologie se stává jednou z nejdiskutovanějších technologií současnosti. Již v dnešní době je její využití značně rozsáhlé. Nalézá uplatnění v mnoha oblastech, jako je elektronika, zdravotnictví, chemický průmysl, stavebnictví, automobilový průmysl, textilní průmysl, kosmický a vojenský průmysl a mnoho dalších.¹

Průkopníkem nanotechnologie se stal americký fyzik a nositel Nobelovy ceny Richard Feynman, který ve své přednášce „There is Plenty of Room at the Bottom“ nastínil, že celá příroda funguje na úrovni molekul a atomů.^{1, 2}

V posledních letech se začíná nanotechnologie významně uplatňovat v biochemii, lékařství, lékařské diagnostice, farmakologii, farmakochemii, mikrobiologii a biotechnologii.³

V současnosti jde zejména o použití různých nanostruktur k cílené distribuci léčiv, diagnostických látek či peptidických fragmentů v organismu. S tím souvisí další povrchové (či jiné) modifikace nanostruktury tak, aby se vážala výhradně na buňky cílového orgánu, dokázala selektivně prostupovat buněčnou membránou, selektivně působila pouze na poškozené buňky, nebo uvolňovala léčivo podle přesně stanoveného harmonogramu. Biodistribuční parametry těchto útvarů lze opět nastavit jejich nanostrukturou.³

Katedra Farmaceutické technologie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy se začala problematikou vlastností a chování nanočástic zabývat v posledních letech.

Předkládaná diplomová práce se zabývá hodnocením průniku nanočástic, značených fluorescenčním barvivem Chromeonem 470, přes sublingvální prasečí membránu.

2 ZADÁNÍ PRÁCE

- 1) Změřit velikost použitých nanočástic pomocí DLS (dynamický rozptyl světla).
- 2) Pozorovat nanočástice ve vzorcích pomocí fluorescenčního mikroskopu.
- 3) Získat experimentální podklady z permeačních pokusů.
- 4) Na základě získaných experimentálních podkladů prokázat možnost průniku nanočástic sublingvální membránou.
- 5) Zhodnotit vliv úpravy sublingvální membrány na průnik nanočástic.

Úprava membrány:

- a) Čerstvá membrána zakonzervovaná azidem sodným.
 - b) Čerstvá membrána zakonzervovaná azidem sodným, hodinu zamražena.
- 6) Porovnat získané výsledky s výsledky, k nimž došla ve své diplomové práci Pavlína Dvořáková, která se zabývala stejnou problematikou, pouze s rozdílem v úpravě sublingválních membrán.

Úprava membrány (Pavlína Dvořáková):

- a) Dlouhodobě zmražená membrána.
- b) Čerstvá membrána uložena ve fyziologickém roztoku.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Bukální/sublingvální podání

Bukální/sublingvální podání se stává vhodným způsobem podání léčiv pro svou dostupnost, jednoduchost a oblíbenost u pacientů. Absorpce přes sliznici dutiny ústní je zejména vhodná u léčiv, která ve značné míře podléhají tzv. *fist-pass* metabolismem, dráždí GIT (gastrointestinální trakt) sliznice, vykazují špatnou GIT propustnost, nebo vyžadují rychlý nástup účinku. I přesto, že bariéru v dutině ústní je obtížnější překonat, léčiva se správnými fyzikálními vlastnostmi mohou být absorbována velice rychle.

Dále může být použita, pokud je nepraktické *enterální* podání (např. u pacientů, kteří mají potíže s polykáním, pocit na zvracení nebo střevní poruchy). Navíc tato aplikace nevyžaduje technické vybavení (např. infúzní pumpy) a odborné znalosti, a je tedy efektivnější než invazivní cesty podání.

Špatně se absorbují ústní sliznicí peptidy a proteiny. Vyvíjejí se ale adjuvantní látky, které umožní lepší absorpci těchto léčiv. Absorpce může být více variabilní než jinými cestami. Bariéra epitelu má za následek absorpci jen malého množství léčiva, proto je vhodné podání ústní sliznicí jenom u léčiv s vysokou potencí. Dodání léčiv ústní sliznicí může být ještě obtížnější při některých patologických stavech, které mají vliv na celistvost sliznice, jako jsou např. puchýře nebo *mukositivity*.⁴

Díky rychlé samoobnově se sliznice dutiny ústní stává atraktivním místem pro lokální i celkové podávání léků. Technologický pokrok v mukoadhezi, postupné uvolňování léčiv, zlepšení propustnosti pomocí enhancerů a přenašečů léčiv, umožňuje efektivní poskytování léků pro léčbu perorálních i systémových onemocnění. Při perorální léčbě onemocnění mohou tyto pokroky vést ke zvýšení terapeutické účinnosti, snížení plýtvání léky a možnosti využití biologických látek (peptidů, genů, protilátek).

Sublingvální vakcinace je bezpečnější a praktičtější alternativou k *intranazální* a k injekčnímu očkování. Tato vakcinace vyvolává protilátkovou slizniční i systémovou reakci.

V současné době existuje mnoho různých lékových forem pro podání léčiv přes sliznici (např. spreje, tablety, ústní vody, gely, pasty a náplasti), ale jen málo léčivých látek je dnes běžně takto aplikováno (např. systémové doručení glycerol

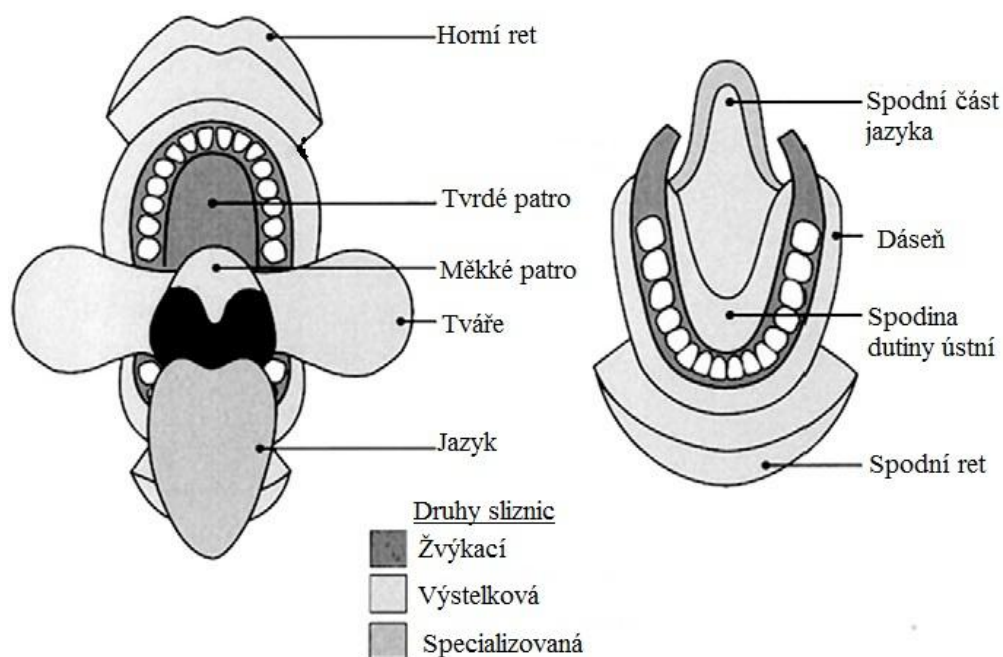
trinitrátu k úlevě při angině pectoris či lokální podání kortikoidů k léčbě zánětlivých onemocnění sliznice dutiny ústní). S rozvojem nových technologií, včetně inhibitorů enzymů, akceleračních propustností a nosičů léčiv se snad výčet léčiv, které mohou být doručeny bezpečně a efektivně skrz sliznici dutiny ústní, zvýší.⁵

3.1.1 Požadavky pro podání léčiva skrz dutinu ústní

Je třeba zvážit mnoho různých faktorů, jako např. přijatelnost pro pacienta, profil uvolňování léčiv a praktičnost jejich použití. Pokud využijeme dutinu ústní k podání léčiva, je třeba, aby léčivá forma měla jednoduchou aplikaci, dobrou stabilitu a musí se dát snadno odejmout v případě výskytu nežádoucích účinků. Léčiva, která nejsnadněji difundují přes sliznici dutiny ústní, jsou rozpustná v tucích, neionizovaná a s nízkou molekulovou hmotností. Dokonce některé větší hydrofilní molekuly mohou difundovat přes epitel sliznice dutiny ústní, např. dextran o molekulové hmotnosti menší než 20 000 Da prochází, kdežto větší dextrany už ne.⁵

3.2 Anatomie a fyziologie dutiny ústní

Dutina ústní je složena z předsíně a vlastní dutiny ústní. Vlastní dutina ústní sahá od štěrbiny úst až po zúžení na přechodu do hltanu. Její ohraničení vpředu a zevně vytváří rty a tváře. Strop dutiny ústní tvoří tvrdé a měkké patro. Spodinu úst vyztužuje svalstvo kryté sliznicí, uprostřed spodiny pak dominuje jazyk, na který sliznice úst přechází. Předsíň dutiny ústní je zevně ohraničena rty a tvářemi, uvnitř pak zuby a dásněmi.⁶



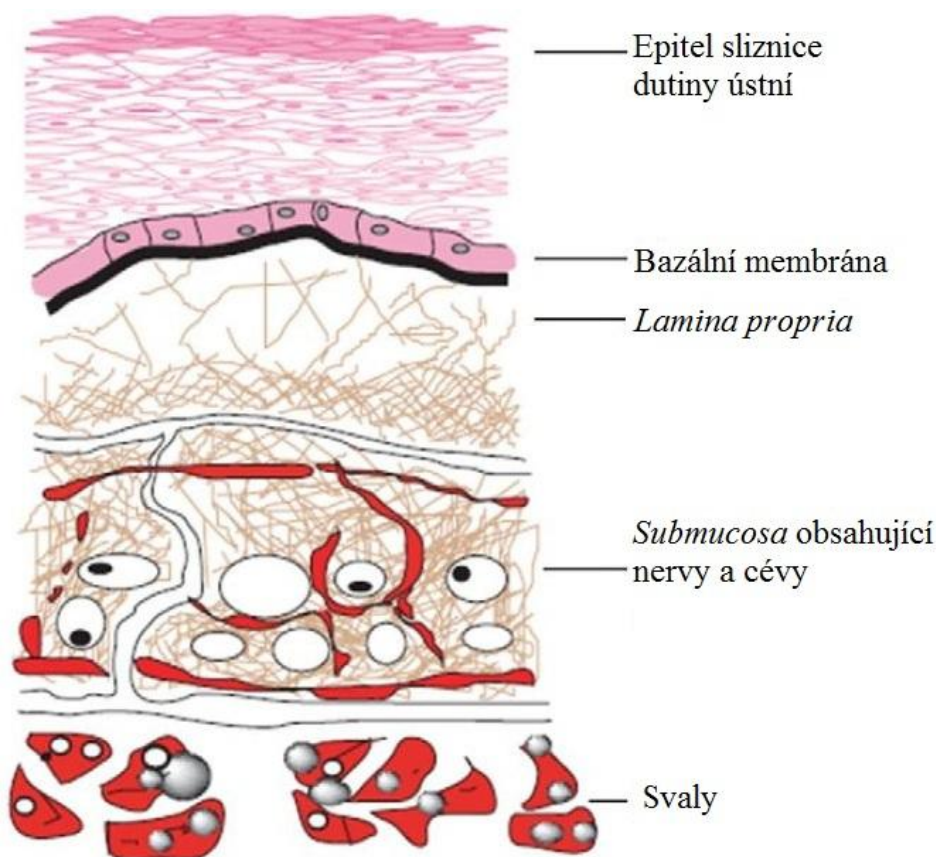
Obrázek č. 1: Anatomická stavba dutiny ústní⁷

Sliznice jako obecný pojem zahrnuje vlhké povrchy, které lemuji stěny různých tělních dutin. Jsou složeny z pojivové tkáně, na níž je vrstva epitelálních buněk, které na povrchu zvlhčují slizniční hlen (sliz). Epitel může být tvořen jednou řadou buněk (jako např. v žaludku, ve střevě, v průduškách) nebo ho tvoří více řad těchto buněk (např. ústní dutina, jícen, vagína, oční rohovka). Rozdíl mezi těmito epitely je právě v tvorbě hlenu. U jednovrstevných epitelů je hlen sekretován pohárkovými buňkami na povrchu sliznice. U vícevrstevných je sliznice propojena se žlázami secernujícími hlen na povrch sliznice. Sliz je bohatý na vodu, glykoproteiny, lipidy a anorganické soli. Síla vrstvy slizu je různá, v ústní dutině je to asi 1 μm .⁸

Jazyk je pohyblivý svalový, sliznicí krytý orgán, který vyčnívá ze spodiny dutiny ústní, svaly je připojen k okolním útvarům. Tělo jazyka lze rozdělit na zadní část - kořen, kterým je jazyk připojen ke spodině dutiny ústní, a přední část. Na těle jazyka rozeznáváme dopředu vybíhající hrot, horní a spodní plocha těla se spojuje v okraje. Horní plocha, nebo-li hřbet, se při zavřených ústech dotýká tvrdého patra.^{6,9}

Slizice dutiny ústní je tvořena shora vrstevnatým dlaždicovým epitelem, což je přechodný epitel mezi epidermis kůže a střevní sliznicí. Klasifikace epitelu do rozpoznatelných buněčných vrstev je obvykle těžká, neboť dobře definované vrstvy chybí. Pod ním se nachází řídké kolagenní vazivo (*lamina propria mucosae*), které obsahuje variabilní množství kolagenu a elastických vláken. Jsou zde obsaženy

také nervy, cévy a hladké svalstvo. Podávané léčivo zde získává přístup k systémové cirkulaci prostřednictvím sítě tepen a kapilár. Spodní vrstvu tvoří v některých oblastech *submukóza*. Pro srovnání: dutina ústní má plochu cca 200 cm², kůže cca 20 000 cm², GIT cca 350 000 cm².



Obrázek č. 2: Stavba sliznice dutiny ústní⁷

Sliznice dutiny ústní zajišťuje mechanickou ochranu proti kompresi a smykovému namáhání, tvoří bariéru pro mikroorganismy, jedy a antigeny, hraje zásadní roli v imunitní obraně (humorální i zprostředkované buňkami), sekret malých žláz sliznice zvlhčuje povrch, pufruje prostředí a obsahuje protilátky. Bohatá inervace registruje hmat, propriocepci, bolest a chuť.

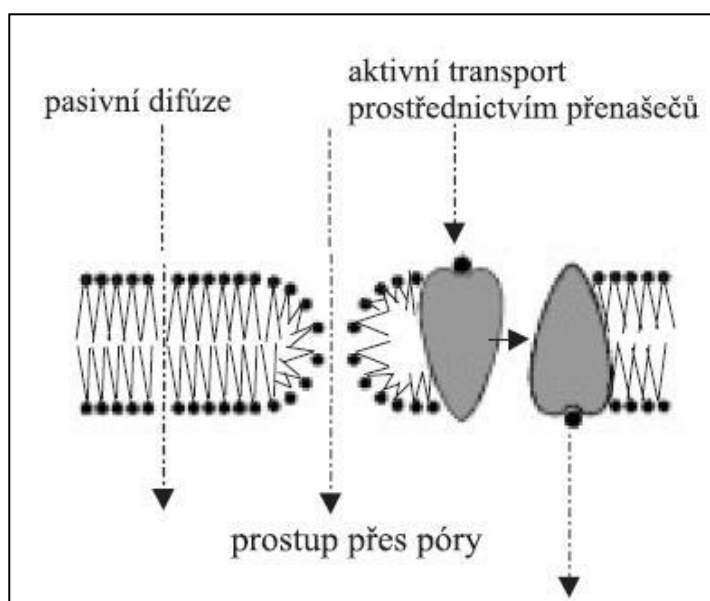
Rozlišujeme tři topografické oblasti sliznice dutiny ústní:

- a) *mastikační (žvýkací)* - díseň a tvrdé patro
- b) *výstelková* - rty, tváře, spodina jazyka, dno dutiny ústní, měkké patro
- c) *specializovaná* - dorsální povrch jazyka

Anatomické a fyziologické rozdíly ve sliznici v dutině ústní jsou hlavními faktory, které způsobují rozdíl v pronikání léčiv mezi lidmi a zvířaty. I když není mnoho variací v síle bukalní sliznice u různých druhů, hlavní mezidruhové rozdíly jsou ve stupni keratinizace a ve složení mikrofóry dutiny ústní.^{10, 11, 12}

Sliznice, která kryje povrch jazyka, je tvořena mnohvrstevným dlaždicovým epitelem. Sliznice jazyka na spodní a vrchní části se liší. Povrch vnitřní (spodní) strany kryje nerohovatějící vrstevnatý dlaždicový epitel, který je shodný se sliznicí dutiny ústní. Povrch hřbetu je rozdělen na dvě části. Zadní třetina je podložena lymfatickou tkání, která tvoří jazykovou mandli. Přední dvě třetiny jsou pokryty sliznicí s množstvím papil. Matný vzhled jazyka způsobují právě vyčnívající papily a zrohovatění povrchu epitelu. Papily rozdělujeme podle tvaru a umístění na hrozené, houbovitě, listovité a nitkovité.^{9,13}

3.3 Prostup léčiv biologickými membránami



Obrázek č. 3: Transport látek přes lipoidní membránu¹⁴

Rozeznáváme 4 základní procesy prostupu látek biologickými membránami

1) **Pasivní difúze přes lipidovou stěnu membrány** je nejdůležitějším transportním mechanismem, který nevyžaduje žádné dodání energie, protože hnací silou je pouze rozdíl koncentrací léčiva na obou stranách membrány. Rychlost difúze je přímo úměrná koncentračnímu gradientu, při jeho vymizení ustává. Na difúzi a na její rychlost mají

také velký vliv vlastností membrány a samotného léčiva. Membrána má lipoidní charakter a difúze je děj, který můžeme popsat tak, že se léčivo v prostředí membrány rozpustí a molekuly léčiva tak putují na opačnou stranu membrány. Z toho vyplývá, že rychle difundovat přes membránu mohou látky mající vysoký rozdělovací koeficient, jejich molekuly nenesou náboj a jsou dobře rozpustné v tucích.

Většina léčiv ale má charakter elektrolytů, které jsou ve vodném prostředí disociovány. Schopnost difundovat pak závisí na jejich stupni disociace, který určuje především pH prostředí a pK_a (záporný dekadický logaritmus disociační konstanty) molekuly.

Vztah mezi pK_a , pH a molární koncentrací disociovaného a nedisociovaného podílu léčiva můžeme vyjádřit pomocí Hendersonovy-Hasselbachovy rovnice:

pro slabé kyseliny:

$$K_a = AH \leftrightarrow A^- + H^+$$

$$pK_a = pH + \log \frac{[AH]}{[A^-]}$$

pro slabé zásady:

$$K_a = B + H^+ \leftrightarrow BH^+$$

$$pK_a = pH + \log \frac{[BH^+]}{[B]}$$

K_a – disociační konstanta

pK_a – záporný dekadický logaritmus disociační konstanty

AH – kyselina

B – báze

pH – záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů

$[AH]/[A^-]$ – koncentrace nedisociované/disociované formy (kyselina)

$[BH^+]/[B]$ – koncentrace disociované/nedisociované formy (báze)

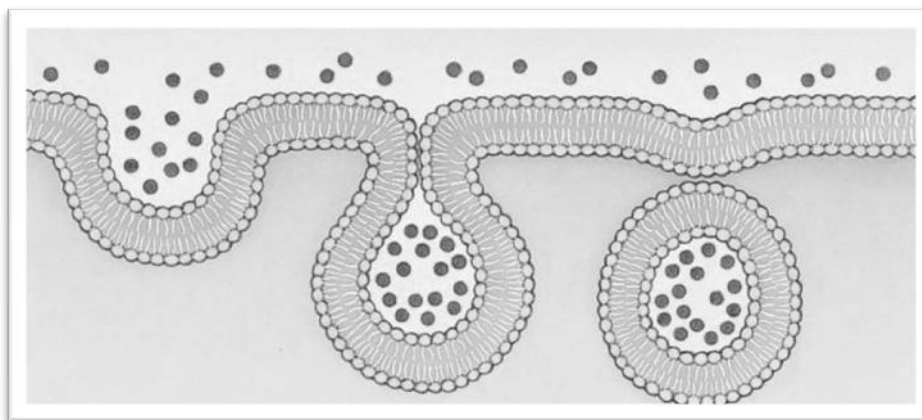
Což znamená, že kyselé látky se lépe vstřebávají v kyselém prostředí, jelikož je zde větší podíl nedisociované formy, která je rozpustnější v lipidech a tak lépe proniká membránami.

Naopak u látek zásaditých dochází v kyselém prostředí k protonizaci a tím k zabránění prostupu membránou.

2) **Prostup léčiva přes membránové póry**, které jsou naplněny vodou, a proto přes ně mají snadný přestup látky rozpustné ve vodě. Limitujícím faktorem je velikost pórů, které propouští pouze molekuly menší než je membránový pór. Tento děj probíhá dvěma mechanismy. Buď prostou difúzí léčiva podle koncentračního spádu, kdy prochází pouze léčivo, nebo filtrací, kdy s léčivem prochází i voda a to na základě rozdílů hydrostatického a osmotického tlaku na obou stranách membrány.

3) **Nosičový a aktivní nosičový transport** probíhá tak, že se léčivo váže na tzv. nosič obsažený v membráně a tvoří s ním komplex, který přenesení léčivo z jedné strany membrány na druhou. Molekula látky se na druhé straně uvolní a nosič putuje zpět. Pokud se tento transport uskutečňuje bez dodání energie, jedná se o tzv. facilitovanou (usnadněnou) difúzi a prostup je závislý na koncentračním spádu. Pokud však je dodávka energie nutná (probíhá proti koncentračnímu spádu), mluvíme o tzv. aktivním nosičovém transportu.

4) **Pinocytózou** se přenáší velké molekuly. Membrána vytvoří výchlípek, která zachytí danou molekulu a vytvoří s ní vakuolu. V této vakuole je přenesena molekula na druhou stranu membrány.^{14,15}



Obrázek č. 4: Pinocytóza¹⁶

3.4 Cesty absorpce léčiva přes sliznici dutiny ústní

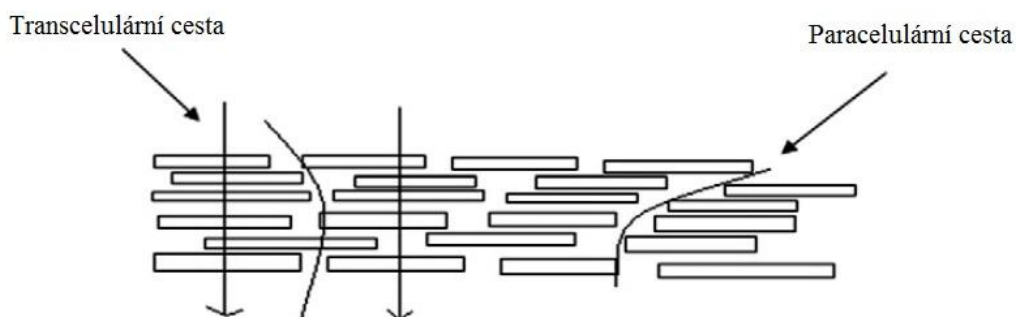
Existují dvě hlavní cesty.

Transcelulární cesta je intracelulární, kde sloučeniny prostupují epitelem napříč buňkami. Prostupnost léčiv přepravovaných touto cestou závisí na jejich rozdělovacím koeficientu mezi lipofilní část (buněčná membrána) a hydrofilní část (intercelulární prostor a cytoplasma).

Paracelulární cesta je mezibuněčná, kde sloučeniny prostupují mezibuněčnými lipidy. Propustnost léčiv závisí na rozdělovacím koeficientu léčiva mezi lipidy mezibuněčných prostor. Lipofilní léčiva prostupují difúzí skrz lipidy mezibuněčných prostor, zatímco hydrofilní léčiva prostupují membránovými kanálky, které jsou naplněny vodou.

Vzhledem k tomu, že epitel dutiny ústní je stratifikovaný, může léčivo na své trase projít oběma cestami.

Mezibuněčné prostory a cytoplasma mají hydrofilní charakter, a proto představují hlavní bariéru průniku lipofilních látek. Buněčná membrána je naopak spíše lipofilního charakteru, což je hlavní bariéru pro hydrofilní sloučeniny.¹¹



Obrázek č. 5: Transcelulární a paracelulární cesta absorpce léčiv⁷

3.5 Absorpce léčiv přes sliznici dutiny ústní

Některé sliznice byly zkoušeny jako možné cesty podání léčiv, včetně sliznice nosu, konečníku, pochvy, sliznice očí a úst. Rektální, vaginální či oční podání je často pro pacienta méně přijatelné, navíc tato podání se především používají při lokální léčbě, mnohem méně pak k léčbě systémové. V kontrastu dutina ústní je snadno přístupná a přijatelná pro podání léčiv.⁵

Úroveň rohovatění sliznic, a tím i bariéra propustnosti, není tak rozsáhlá jako *stratum corneum* u kůže. Tato vrstva pokožky je hlavní bariérou průniku a tedy i absorpce léčiv přes kůži.

Sliznice jsou velice bohaté na krevní zásobení, které napomáhá rychlému transportu léčiva do systémové cirkulace. Léčivo se aplikuje přímo na místo resorpce, po rozpuštění podané dávky slinami vznikne roztok o velmi vysoké koncentraci, což umožní rychlejší průnik epitelem ústní sliznice.^{17, 18, 19, 5}

Toto podání není vhodné pro látky špatně rozpustné ve vodě a pro látky, které se špatně resorbují. Ty se pak lépe vstřebávají při obyčejné *perorální* aplikaci, jelikož množství tekutiny obsažené v tenkém střevě i jeho resorpční povrch je značně větší než v ústní dutině.

Ve většině případů je to také možnost, jak lze obejít tzv. first-pass metabolismus, čímž dochází k lepší využitelnosti léčiva v podstatně menších dávkách. Tato aplikace léčiva také zabraňuje bezprostřední degradaci léčiva žaludeční kyselinou jako u *perorálního* podání.

Absorpce léčiv závisí na koncentraci léčiva, prostředí transportu léčiva, dostatečném kontaktu se sliznicí, dostatečném cévním zásobení ve slizniční tkáni, míře ionizace léčiva a pH v místě absorpce, velikosti molekuly léčiva a jeho relativní lipofilitě. pH slin je kolem 6,5-6,9, nejlépe se tedy resorbují léčiva s vysokou hodnotou pK_a .^{17, 18, 19}

Aby léčivo dosáhlo systémové absorpce, musí mít vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti. Těmito vlastnostmi jsou malé rozměry molekuly léčiva ($M_r < 500 \text{ g/mol}$), rozdělovací koeficient ($\log P$) 2-4 a vysokou rozpustnost ve slinách při daném pH.

Sublingvální region má obecně vyšší propustnost pro léčiva, než zbytek dutiny ústní. Bylo zjištěno, že propustnost vody sliznicí dutiny ústní je cca 10x vyšší, než v kůži, zatímco na spodině úst je propustnost cca 20x vyšší (viz **kapitola 3.6.1**)

Nicméně na rozdíl od bukalní sliznice se nejeví jako vhodný region pro použití bioadhezivních systémů, zejména z důvodu struktury a mobility tkáně v této oblasti.¹⁶

Bioadheze je meziplošný jev, při kterém dva materiály, alespoň však jeden z nich je biologického původu, drží pohromadě pomocí mezifázových sil. Mukoadheze pak specifikuje, že jeden z těchto materiálů je právě slizniční mucin. Druhý materiál většinou představují různé polymery a kopolymery.¹²

3.6 Fyziologické bariéry absorpce léčiv přes sliznici dutiny ústní

Přirozené prostředí v dutině ústní představuje některé významné faktory pro systémové podání léků. Léčivo se musí dobře uvolňovat z lékové formy na daném místě (bukální, sublingvální sliznice) a přes slizniční vrstvy vstoupit do krevního oběhu. Některé fyziologické aspekty ústní dutiny hrají v tomto procesu významnou roli, včetně pH tekutin, aktivity enzymů a propustnost sliznice dutiny ústní. Struktura sliznice a její

možnost samoobnovy je také určujícím faktorem propustnosti pro systémy podávání léčiv, které jsou určeny pro prodloužené uvolňování v dutině ústní (např. mukoadhezivní systémy).

Průtok krve přes sliznici dutiny ústní je značný, a není považován za rychlost limitující faktor při vstřebávání léčiv touto cestou. Při perorálním podání prostřednictvím GIT, léčivo prochází před vlastní absorpcí poměrně nepřátelským prostředím. To zahrnuje radikální změnu pH (od 1,2 v žaludku až 7,0-7,4 v distálním střevě), přítomnost mnoha trávicích enzymů a střevní mikroflóry. V kontrastu tohoto drsného prostředí GIT, ústní dutina nabízí relativně konzistentní a vhodné fyziologické podmínky pro podání léků, které jsou udržovány kontinuální sekrecí slin. Ve srovnání se sekretem GIT mají sliny nižší viskozitu, omezenou enzymatickou činnost a prakticky jsou bez proteáz. Enzymová degradace v GIT se stává velkým problémem při perorálním podání léčiv. Enzymy, které jsou přítomné v ústní sliznici, představují především aminopeptidázy, karboxypeptidázy, dehydrogenázy a esterázy. Aminopeptidázy mohou představovat hlavní metabolickou překážku pro doručení peptidů.

Léčivo prostupuje skrz sliznici dutiny ústní řadou bariér: lipofilní bariéra, kterou představuje buněčná membrána, hydrofilní bariéra uvnitř buněk a enzymatická bariéra. Bariéru propustnosti tvoří také přítomnost mezibuněčného materiálu a to tzv. membránových granulí (MCGs). Jsou to kulaté/oválné granule o velikosti v průměru 1-3 μm a jsou umístěny ve střední buněčné vrstvě zrohovatělého i nezrohovatělého epitelu. MCGs se začínají tvořit, když buňky prochází diferenciací. Fúzí s plazmatickou membránou na povrchu buněk a vypouštějí svůj obsah do mezibuněčných prostor, aby zajistily soudržnost epitelu v povrchových vrstvách, čímž mohou snižovat propustnost různých léčiv. Komponenty z MCGs ve zrohovatělém a nezrohovatělém epitelu jsou různé. Funkce těchto organel jsou zesílení membrány, adheze buněk a produkce buněčného obalu. Snížená propustnost keratinizovaného epitelu v porovnání s epitelem nekeratinizovaným je spojena s obsahem lipofilních granulí, než s obsahem samotného keratinu.^{5, 7, 11}

3.6.1 Propustnost sliznice dutiny ústní

Propustnost sliznice dutiny ústní klesá v pořadí sublingvální, bukalní, tvrdé a měkké patro. Toto pořadí je založeno na míře keratinizace a relativní síle těchto tkání.

Sliznice z oblasti podléhající mechanickému namáhání (dásně a tvrdé patro) je tvořena zrohovatělým epitelem, který obsahuje neutrální lipidy, jako jsou ceramidy a acylceramidy. Tento epitel je relativně nepropustný pro vodu. Naproti tomu sliznice měkkého patra, sublingvální a bukální oblast je tvořena epitelem nerohovatějším. Ten obsahuje jen malé množství ceramidů a dále také neutrální polární lipidy, především cholesterol. Tento typ epitelu je mnohem více propustný pro vodu.

Propustnost je nepřímo úměrná míře keratinizace a síle tkání. Malé molekuly jsou schopny rychle pronikat přes sliznici dutiny ústní. Existuje inverzní vztah mezi rychlostí prostupu a velikostí molekuly. V případě absorpce přes sliznici dutiny ústní, je vliv velikosti molekuly mnohem méně významný než vliv rozdělovacího koeficientu a rozpustnosti.

Propustnost také závisí na ionizaci léčiv, což je charakteristické pro pasivní difúzi. Zvýšení podílu neionizované formy léčiva, umožňuje jeho lepší průnik transcelulární cestou. Stupeň ionizace závisí na pH dutiny ústní a pK_a léčiva. Hodnota pH v dutině ústní je rozhodující pro úspěšné podání a absorpci léku. Nejvyšší propustnost byla pozorována při hodnotách pH, kdy bylo léčivo z větší míry v neionizované formě. Je to způsobeno tím, že neionizovaná forma je lépe rozpustná v tucích a tím pádem lépe proniká membránou dutiny ústní.^{7, 11}

3.6.2 Sliny a hlen^{7, 11, 21}

Vylučování slin je ovlivňováno fyziologickým prostředím dutiny ústní, ve smyslu pH, složení a objemu tekutin. Sliny jsou vylučovány třemi velkými slinnými žlázami (příušní, podčelistní a sublingvální) a menšími slinnými nebo ústními žlázami nacházejícími se bezprostředně pod sliznicí. Příušní a podčelistní slinné žlázy vylučují sliny s větším obsahem vody, kdežto sublingvální žlázy vylučují převážně viskózní sliny s omezenou enzymatickou aktivitou.

Mezi hlavní funkce slin patří udržování dostatečné vlhkosti dutiny ústní, usnadňování polykání a zabránění demineralizace zubů. Umožňuje také trávení sacharidů a reguluje ústní mikroflóru udržováním pH a enzymů.

Denní celkové množství slin je mezi 0,5 a 2,0 l. Nicméně, množství slin, které je neustále přítomno v ústech, je přibližně 1,1 ml, a tím si zajišťuje relativně nízký objem kapaliny pro uvolňování léčiv z nosičů ve srovnání s GIT. Ve srovnání s tekutinou v GIT, mají sliny relativně nízkou viskozitu s obsahem 1% organických a anorganických látek.

Sliny je možné označit jako slabý pufr s pH okolo 5,5-7,0. pH a složení slin jsou závislé na průtoku slin, který zase závisí na třech faktorech: na denní době, druhu stimulu a stupni stimulace. Například zvyšující se koncentrace sodíkových a hydrogenuhličitanových iontů a zvyšující se průtok vede ke zvýšení pH. Sliny poskytují bohaté vodné prostředí ústní dutiny, které se může stát výhodou pro uvolňování léčiv z jejich nosičů a to zejména z hydrofilních polymerů. O časovém rozsahu absorpce léčiva rozhoduje tok slin. Ačkoli sekrece slin usnadňuje rozpustnost léčiv, nezáměrné polykání slin může mít za následek nedostatečnou absorpci v místě podání.

Kyselé pomocné látky mohou stimulovat sekreci slin, což je důležitý aspekt při výběru složení pomocných látek pro přípravu lékové formy. Zvýšením toku slin můžeme snížit absorpci léčiva. Pronikání některých léčiv skrz sliznici dutiny ústní bylo zvýšeno tím, že byla přidána anticholinergní látka, což vedlo ke snížení vylučování slin.

Buňky epitelu dutiny ústní jsou obklopeny hlenem, což je viskoelastická gelová vrstva složená z komplexů bílkovin a sacharidů a její tloušťka je v rozmezí 40-300 μm . Tato vrstva chrání tkáň vystavenou vnějšímu prostředí. Působí jako fyzická překážka pro průnik léčiva, ale může být také výhodná při použití bioadhezivních forem podání. Na sliznici dutiny ústní je hlen vylučován hlavními a vedlejšími slinnými žlázami jako součást slin. Ačkoli je hlen tvořen převážně vodou (cca 95-99%), klíčové jsou makromolekulární složky z třídy glykoproteinů, známé jako muciny. Muciny jsou makromolekulární látky s molekulovou hmotností od 0,5 do více než 20 MDa a obsahují ve své struktuře velké množství sacharidových jednotek. Muciny jsou složeny ze základních jednotek (cca 400-500 kDa) propojených do lineárních řetězců. Tyto velké molekuly se mohou propojit a tvořit tak trojrozměrnou síť, která působí jako lubrikant umožňující pohyb buněk vůči sobě a přispívá k buněčné adhezi. Jsou to velice flexibilní molekuly s výjimkou určitých patologických stavů (chronická obstrukční plicní nemoc či cystická fibróza).

Kromě mucinů hlen obsahuje také bakterie, tuky, soli, bílkoviny, makromolekuly a zbytky buněk. Jeho viskozita je obvykle 1000-10000x vyšší než viskozita vody. Hodnota pH se může značně lišit v závislosti na povrchu sliznice. V kyselém prostředí se významně zvyšuje viskoelastická hleny, jelikož dochází ke shlukování větších množství mucinových vláken. Plicní a nosní hlen je obecně pH neutrální, hlen oka mírně bazický. Žaludeční hlen je vystaven širokému rozmezí pH. Poševní sekret

je z důvodu vylučování kyseliny mléčné kyselé povahy. Síla vrstvy hlenu se také liší pro různé sliznice.

Dalším faktorem, který může ovlivnit mukoadhezi léčiv je čas obnovy sliznice. Pro ústní epitel je to 3-8 dní ve srovnání s asi 30 dny na kůži.

Bariérové funkce závisí nejen na fyzikálně-chemických vlastnostech přípravku, ale také na fyzikálně-chemických vlastnostech membrány a její relativní tloušťce.

Místo absorpce	Odhadovaná absorpční plocha	Procentuální část z celkové plochy	pH	Objem tekutiny	Enzymová aktivita	Kapacita absorpce léčiva
Dutina ústní	0,01 m	0,01	5,8-7,6	0,9 ml	střední	střední
Žaludek	0,1-0,2 m	0,20	1,0-3,0	118 ml	vysoká	střední
Tenké střevo	100 m	98,76	5,0-7,0	212 ml	vysoká	vysoká
Tlusté střevo	0,5-1 m	0,99	6,0-7,4	187 ml	střední	nízká
Konečník	0,02-0,04 m	0,04	7,0-7,4	---	nízká	nízká

Tabulka č. 1: Srovnání různých druhů sliznic⁷

Sliznice	Struktura	Tloušťka (μm)	Obnova sliznice (dny)	Absorpční plocha (cm ² ±SD)	Propustnost	Doba zdržení	Tok krve
Bukální	NK	500-600	5,0-7,0	50,2±2,9	střední	střední	20,3
Sublingvální	NK	100-200	20	26,5±4,2	velmi dobrá	špatná	12,2
Dásně	K	200	---	---	špatná	střední	19,5
Tvrdé a měkké patro	K	250	24	20,1±1,9	špatná	velmi dobrá	7

Tabulka č. 2: Charakteristika různých lokalit dutiny ústní⁷ – NK-nekeratinizovaná tkáň, K-keratinizovaná tkáň, tok krve (ml/min/100 g tkáně), Směrodatná odchylka (SD)

3.7 Nanotechnologie a nanočástice

Hlavními cíli medicíny jsou brzké a přesné stanovení diagnózy klinických stavů a poskytování účinné léčby bez vedlejších účinků. Za tímto účelem probíhá vývoj nových materiálů a zařízení pracujících v rozsahu nanometrů.

Bezpečné a cílené doručení léčiva může zlepšit postavení některých klasických léčiv na trhu, a kromě toho bude mít důsledky pro rozvoj a úspěch nových léčebných postupů. Nanočástice byly vyvinuty jako důležitá strategie podávání konvenčních léků, rekombinantních proteinů, vakcín a nedávno i nukleotidů. Podání většiny léčiv

je limitováno pro jeho špatnou rozpustnost, vysokou toxicitu, vysoké dávky, agregace následkem špatné rozpustnosti, nespecifické doručení, *in vivo* degradaci a krátký biologický poločas.

Vývoj technik, které by selektivně dodávaly léčiva do patologické lokality, je v současnosti jednou z nejdůležitějších oblastí výzkumu léčiv.^{22, 23}

Nanotechnologii lze definovat jako technický obor zabývající se výzkumem a vývojem materiálů nebo systémů, jejichž alespoň některé charakteristické rozměry mají velikost řádově v jednotkách až stovkách nanometrů. Fyzikální i chemické vlastnosti jednotlivých částic jsou poměrně dobře definovány.²⁶

Nanotechnologie je mnohými považována za „velkou revoluci“. Nanomedicina má velký příslib pro další vývoj léčebných procedur a terapií v oblastech, jako je zpracování obrazu, rychlejší diagnostika, doručení léčiv a regenerace tkání, stejně jako vývoj nových léčiv. Materiály a zařízení manometrických rozměrů, která jsou již schválená pro klinické použití a řada výrobků, je hodnocena v klinických studiích. Nicméně existují toxikologické obavy a etické otázky, které vrhají stín na slibnou budoucnost tohoto nového oboru.²²

Termín nanočástice obecně označuje částice velikosti 1-100 nm. Nicméně v oblasti farmacie a léčiv jsou submikronové částice označovány také jako nanočástice. V závislosti na jejich složení, funkci a morfologii se nanočástice rozdělují na nanokrystaly, polymerní částice, lipozomální nanočástice a nanočástice pevných lipidů.

Malá velikost nanočástic přináší významné zvýšení poměru povrchu k objemu, což vede ke značně odlišnému chování a to jak *in-vitro*, tak *in-vivo* v porovnání s tradičními mikročásticemi. V důsledku toho se léčiva ve formě nanokrystalů používají v různých lékových formách pro různé účely, jako je zlepšení biologické dostupnosti léčiv špatně rozpustných ve vodě s využitím zvýšené rozpustnosti a rychlejšího rozpouštění nanočástic.²⁴

3.7.1 Nanomateriály

Jsou to takové materiály, jejichž stavebními prvky jsou nanočástice s přesně definovanými vlastnostmi. Prostorovým seskupením nanočástic lze tvořit další útvary (vlákna, trubice, tenké vrstvy), proto se u nanostruktur striktně nepožaduje, aby každý rozměr částice byl v nanometrech. Nanovlákna tvoří totiž důležitou skupinu pro celou řadu lékařských aplikací.²⁶

3.7.2 Nanotechnologie jako řešení pro podávání léků

Nanotechnologie vytváří a využívá materiálů, zařízení a systémů prostřednictvím ovládání hmoty v nanometrové škále, tj. na úrovni atomů, molekul a supramolekulárních struktur. Nanotechnologie mohou podpořit inovativní využití nesčetných stávajících léků vyráběných farmaceutickým průmyslem.

Nanotechnologie se zaměřuje na formulování terapeutických zástupců do biokompatibilních nosičů, jako nanočástic, nanokapsulí, micelárních systémů a dendrimerů. Jedna z hlavních výhod, kterou nanotechnologie nabízí je doručení léčiva na místo poškození. Toho lze dosáhnout buď pasivním, nebo aktivním cílením léčiva na určité místo.

1) Pasivní cílený transport

- Zvýšená propustnost a retence

Pasivní cílený transport využívá anatomických a fyziologických rozdílů zdravé a poškozené tkáně pro doručení léčiva na požadované místo. Fyziologie poškozené tkáně může být různě pozměněna a to prostřednictvím zvýšení propustnosti a retence. Například cévy nádoru jsou propustnější a tím se nanočástice dostanou do nádorové tkáně lépe, než do zdravé tkáně. Totéž platí pro místo zánětu.

- Lokalizované podání

Jiný přístup je podání protinádorové látky prostřednictvím nanočástic přímo do nádoru.

2) Aktivní cílený transport

Aktivní cílený transport vyžaduje specifickou konjugaci ligandu s receptorem. Úspěšnost cílení závisí na výběru vhodné molekuly, která má vysokou afinitu a specifitu k vazbě na receptory na povrchu buňky. Výsledky studií naznačují, že cílené nanočástice mohou poskytnout vyšší intracelulární dodávky terapeutických látek na nádorové buňky v solidních nádorech, než jejich necílené analogy. U nanočástic s upraveným povrchem byla potvrzena zvýšená vazba na cílové buňky než u neupravovaných nanočástic.²³

3.7.3 Nevýhody použití nanočástic v terapii

Rozsáhlé *in vivo* použití nanočástic bude vyžadovat podrobnější zkoumání fyzikálně-chemických vlastností a fyziologických procesů probíhajících v biologickém prostředí. Zatím není možné předpovědět biodistribuci nanočástic na základě jejich vlastností. Kromě toho může mít biodistribuce nanočástic nežádoucí vliv na interakci

s biologickými systémy a molekulami, jako jsou bílkoviny. Když se nanočástice dostane na své cílové místo, nemůže snadno vstoupit do biologického systému, např. buněk a organel, snadno a to i přes svou malou velikost. Proto je nezbytné navrhnout strategie, které zaprvé umožní nanočástici identifikovat povrch svých cílových buněk a za druhé umožní nanočásticím vstup do buňky a přístup k určitým organelám. Uvnitř buňky může být částice strukturálně beze změny, nebo může být změněna či metabolizována. Studie zaměřené na zkoumání, jak jsou částice zpracovány metabolicky, stále chybí. V ideálním případě by měla částice být degradována a vylučována bez jakýchkoli toxických účinků na organismus. Vhodné by mohly být nanočástice, které jsou obaleny biodegradabilními polymery. Další možností by bylo navrhnout nové částicové systémy, které by byly složeny z těchto biodegradabilních polymerů.²²

3.8 Nanotoxikologie

Stejné vlastnosti, které jsou pro nanočástice unikátní, jako jejich malá velikost, velký povrch, chemické složení, rozpustnost a geometrie, by mohly být zodpovědné za jejich případné nebezpečí pro lidské zdraví. V současné době se nedá předvídat celkové chování nanočástic, jakmile vstoupí do těla, pokud jde o nespecifickou adsorpci, orgánovou distribuci, či dobu působení. Ve snaze kontrolovat a minimalizovat nežádoucí účinky nanočástic se zkoumají různé chemické postupy povrchové úpravy přidáním funkčních skupin na jejich povrch. Modifikace povrchu nanočástic navázáním polyethylenglykolu (PEG) slouží k minimalizaci jejich vyhledání endogenními proteiny a tím dochází ke zvýšení poločasu jejich cirkulace v oběhu a k zabránění jejich pohlcení fagocytomakrofágovým systémem. V současné době je naše znalost zdravotních účinků omezená. Proto je třeba při vývoji nanočástic současně hodnotit toxikologické účinky těchto nových materiálů.²²

3.9 Fyzikální a chemická stabilita nanočásticových léčiv

Stabilita je jedním z kritických aspektů při zajišťování bezpečnosti a účinnosti léčivých přípravků.

V intravenózně podané nanosuspenzi by se tvorba větších částic ($>5\ \mu\text{m}$) mohla projevit bloádou kapilár a embolií. Proto se distribuce velikostí částic musí během skladování pečlivě sledovat. Problémy se stabilitou nanočástic léčiva by mohly vzniknout v průběhu výroby, skladování a přepravy. Vysoký tlak nebo změna teploty

v průběhu výroby může způsobit změnu krystalinity částic. Skladování a přeprava léčivých přípravků může způsobit problémy se stabilitou, jako je sedimentace, aglomerace či růst krystalů.²⁴

3.9.1 Vliv lékové formy na stabilitu

Ačkoli různé lékové formy mohou sdílet některé běžné problémy se stabilitou, jako jsou sedimentace, aglomerace částic či růst krystalů, důsledek při jejich podání do organismu může být zcela odlišný (např. aglomerace částic u plicních léčiv ovlivňuje množství a místo účinku a tím i účinnost léku, aglomerace u intravenózních přípravků může způsobit ucpání krevní kapiláry a bránit tak průtoku krve).

Výběr stabilizátorů úzce souvisí s disperzitou prostředí. V současné době je schválená široká škála stabilizátorů pro perorální aplikaci, zatímco pomocné látky povolené k inhalaci jsou velmi omezené.

Pevné lékové formy mají obvykle dobré skladovací stabilitní profily, což je důvod, proč společná strategie pro zvýšení stability nanočástic je transformovat jejich suspenze do pevných lékových forem. Většina hlášených obav souvisejících se stabilitou léčivých přípravků se týká nanosuspenzí, ve kterých jsou nanočástice rozptýlené v mediu s nebo bez stabilizátorů.²⁴

3.9.2 Možné stabilitní problémy nanosuspenzí

Problémy se stabilitou mohou být klasifikovány jako fyzikální a chemická stabilita. K problémům týkající se fyzikální stability patří sedimentace/krémovatění, aglomerace, růst krystalů a změna stavu krystalinity.

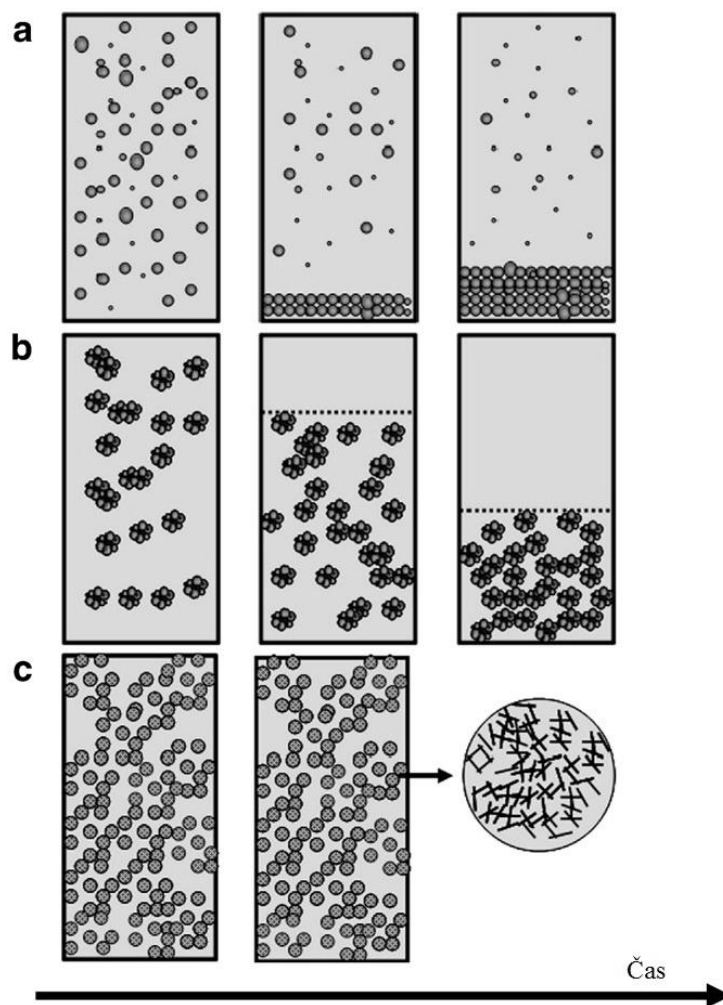
1) Sedimentace/krémovatění

Částice léčiva mohou buď sedimentovat nebo krémovatět v mediu v závislosti na jejich relativní hustotě v porovnání s hustotou média. Sedimentace je popsána pomocí Stokesova zákona, který říká, že rychlost sedimentace souvisí s velikostí částic. Snížení velikosti částic je nejběžnější strategie používaná k omezení usazování částic. Dalším široce užívaným opatřením proti sedimentaci je zvýšení viskozity média, čímž se sníží rychlost sedimentace.²⁴

Typy sedimentace:

- *Deflokulovaná suspenze* – částice malé velikosti se usazují samostatně, vytváří se sediment, který je těžko roztřepatelný.

- *Flokulovaná suspenze* – částice se usazují jako volné agregáty, mají větší velikost ve srovnání s jednotlivými částicemi a tudíž i vyšší sedimentaci, volná struktura zachycuje i určité množství media, sediment je snadno roztřepatelný.
- *Struktura tzv. „otevřených vloček“* – nanočástice pospojované do tyčinek tvoří dlouhodobě stabilní strukturu pomocí Van der Waalsových sil



Obrázek č. 6: Typy sedimentace – a) deflokulovaná suspenze, b) dokulovaná suspenze, c) struktura tzv. „otevřených vloček“²⁴

2) Aglomerace

Velký povrch nanočástic vytváří velkou povrchovou energii. Tato situace je termodynamicky nepříznivá. Z tohoto důvodu mají částice tendenci se shlukovat, čímž dochází k minimalizaci povrchové energie.

Aglomerace může způsobit řadu problémů, jako je rychlá sedimentace/krémovatění, růst krystalů. Nejčastější strategií pro řešení tohoto problému

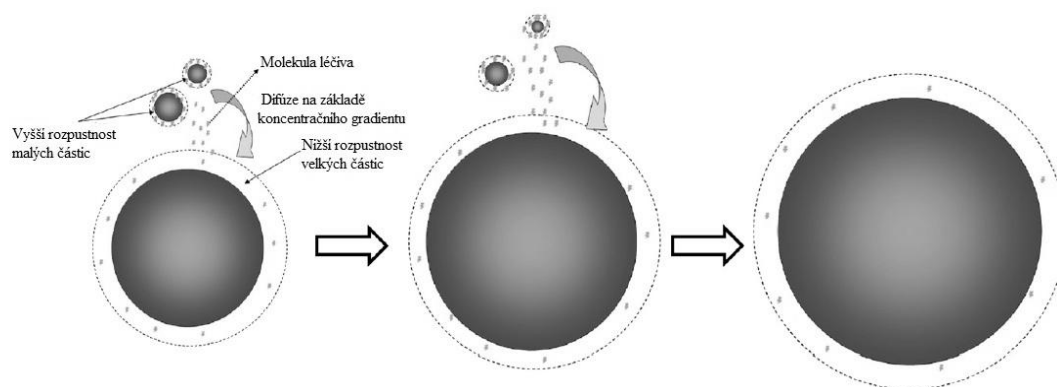
je přidání stabilizátorů, jejichž schopností je smáčet povrch částic. Existují dva hlavní mechanismy, které se používají k stabilizaci suspenzí ve vodném i nevodném prostředí - elektrostatické odpuzování a stérická stabilizace.²⁴

Takto působí peptizátory. Naadsorbují se na povrch částic, udělují jim elektrický náboj a zvyšují jejich solvataci. Částice získávají souhlasný náboj, vzájemně se odpuzují a nemají tendenci tvořit aglomeráty. Odpuzující energie částic je charakterizována zeta potenciálem (ZP). Čím je vyšší ZP, tím je tendence k aglomeraci částic nižší. Optimální potenciál je kolem 100 mV.²⁵

3) Růst krystalů

Růst krystalů v koloidní suspenzi je všeobecně znám jako Oswaldovo zrání a je zodpovědný za změny velikosti částic a distribuce jejich velikosti.

Jedná se o přenos látky z drobnějších částic na částice větší probíhající v polydisperzní soustavě v důsledku větší rozpustnosti malých částic. Toto snižování stupně disperzity probíhá až do přeměny disperzní soustavy na soustavu dostatečně hrubě disperzní, v níž jsou rozdíly rozpustnosti již velice nepatrné, a rychlost Oswaldova zrání je již malá. Velké částice rostou na úkor malých částic, což následně vede k posunu velikosti a rozdělení velikostí částic koloidní suspenze k vyšším hodnotám velikostí částic a ke snížení polydisperzity.



Obrázek č. 7: Oswaldovo zrání²⁴

Úzká distribuce velikosti částic může vést ke snížení gradientů koncentrací léčiva v médiu a tak brání výskytu Oswaldova zrání.

Stabilizátory adsorbované na povrchu částic snižují povrchové napětí mezi částicemi a kapalným médiem a tak brání růstu krystalů. Růst krystalů ovlivňuje také teplota, mechanická energie a rozpustnost.²⁴

4) Změna krystalického stavu

Krystalický stav je jeden z nejdůležitějších parametrů ovlivňujících stabilitu léčiv, rozpustnost a účinnost.

Hlavní problém představuje transformace mezi amorfním a krystalickým stavem. Vysoce energetická amorfní částice je nestabilní a má tendenci se transformovat na nízkoenergetickou krystalickou částici. K tomuto převodu dochází na základě různých parametrů, jako je teplota, disperzní prostředí, přítomnost stabilizátorů a krystalizačního jádra.

5) Problémy se stabilitou při sušení nanosuspenzí

Pokud není možno dosáhnout dostatečné stability nanosuspenze, pevná léková forma se stává nejlepším řešením. Nejběžnější procesy výroby pevné lékové formy jsou lyofilizace a sušení rozprašováním. Během procesu sušení musí být zabráněno růstu nanokrystalů a aglomeraci, aby byla zachována funkce nanočástic a to rychlý rozpad po rozpuštění. Překonání problémů se stabilitou při sušení se provádí přidáním mannitolu, sacharózy a celulózy.²⁴

3.9.3 Chemická stabilita

Jelikož jsou v nanosuspenzi obvykle rozptýleny omezeně rozpustné nanokrystaly léčiva, možnost chemických reakcí zde není tak velká. Proto je chemická stabilita nanosuspenze obecně lepší než v roztocích.

Na rozdíl od fyzikálních problémů se stabilitou, které jsou společné všem nanosuspenzím, chemická stabilita je individuální u každého léčiva. Každá molekula má své funkční skupiny a ty mají každá svůj mechanismus, který ovlivňuje stabilitu (např. hydrolytická degradace u esterů a amidů, či oxidační reakce aminoskupiny).²⁴

3.9.4 Další otázky týkající se stability velkých biomolekul

Velkými biomolekulami jsou myšleny zejména terapeutické proteiny a peptidy. Jejich molekulární struktura je výrazně odlišná a složitější v porovnání s malými molekulami. U velkých biomolekul rozlišujeme primární, sekundární, terciární a kvartérní strukturu.

Neporušená molekulární struktura těchto látek je nezbytná k udržení terapeutické účinnosti. K častým stabilitním problémům patří deaminace, oxidace, acylace, agregace a adsorpce na povrchu. Tyto problémy jsou ovlivněny teplotou, pH, ionizací, koncentrací soli, koncentrací bílkovin.²⁴

3.9.5 Charakterizace stability nanočástic léčiva a nanočástic v lékové formě

- Velikost částic, distribuce velikosti a morfologie

Velikost částic a jejich distribuce jsou klíčové parametry pro hodnocení fyzikální stability nanočástic. K technikám, které se používají k určení těchto parametrů, patří dynamický rozptyl světla (DLS) také známá jako foton korelační spektroskopie (PCS), laserová difrakce (LD), Coulterův počítač.

DLS technika je schopna měřit průměrnou velikost částic a distribuci jejich velikostí jako index polydisperzity (PDI) v kapalném médiu. Hodnota PDI 0,1-0,25 znamená úzkou distribuci velikosti částic, PDI > 0,5 poukazuje na široký rozsah distribuce. Bohužel tato technika není schopna měřit velikost částic suchého prášku a její rozsah měření je příliš úzký (3 nm-3 μ m). Proto je DLS doplňováno LD.

LD má mnohem širší rozsah detekce (20 nm-2000 μ m) a může být použita k posouzení u suspenze i práškových léčiv. Typické charakteristiky pro LD jsou LD50, LD90, LD99, což znamená, že 50, 90 nebo 99 % částic má menší velikost. LD je obzvláště vhodné pro charakterizaci parenterálních a plicních suspenzí díky širokému rozsahu měření. Nicméně LD poskytuje jen relativní distribuci.

Coulterův počítač umožňuje určení absolutního počtu částic na jednotku objemu pro jednotlivé velikostní třídy, je přesnější než LD.

I když PCS, LD a Coulterův počítač poskytují rychlé měření velikosti a distribuce velikostí částic, nelze pomocí nich hodnotit morfologii částic. Pro hodnocení tohoto parametru se používá jako přímé vizualizační techniky rastrovací elektronový mikroskop (SEM), transmisní elektronový mikroskop (TEM), mikroskop atomárních sil (AFM). Tyto techniky ale vyžadují obvykle další úpravu vzorku, což může způsobit určité změny ve vlastnostech částic.

- Sedimentace/krémovatění

Tradiční metodou pro vyhodnocení sedimentace je její vizuální pozorování v průběhu času. Na základě měření objemu usazených částic nebo objemu krémové vrstvy k poměru celkového objemu přípravku, bezrozměrných parametrů známých jako sedimentace a flokulace lze získat i kvantitativní hodnocení stability suspenze.

- Povrchový náboj částic

K měření zeta potenciálu se obvykle používá elektroforéza spojená s laserovou Dopplerovou velocimetrií. Tato technika hodnotí elektroforetickou pohyblivost suspendovaných částic v médiu. ZP nad 60 mV značí vynikající stabilitu, zatímco 30 mV dobrou stabilitu, 20 mV akceptovatelnou krátkodobou stabilitu a méně

než 5mV rychlou agregaci částic. Toto pravidlo platí pouze u čistě elektrostatické stabilizace nebo pro kombinaci se stabilizátory o nízké molekulové hmotnosti a neplatí pro stabilizátory o velké molekulové hmotnosti.

- Krystalický stav

Krystalinita nanočástic je obvykle hodnocena rentgenovou difrakcí (XRD) a/nebo diferenční skenovací kalorimetrií (DSC). XRD rozlišuje amorfni a krystalické nanočástice, stejně jako různé polymorfni fáze částic, zatímco DSC je často používán spíše jako doplňující technika k XRD. Krystalické částice mají obvykle ostrý bod tání, který není u amorfni částic. Bod tání také může rozlišovat jejich různé polymorfismy.

- Chemická stabilita

Pro vyhodnocení chemické stability se nejčastěji používá technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která poskytuje i přesnou kvantitativní analýzu přítomných nečistot. Pro identifikaci nečistot ve vzorku je HPLC často ve spojení s hmotnostní spektroskopií (MS).

- Další techniky pro hodnocení

U velkých molekul jsou techniky měření vybírány podle úrovně posuzované molekulové struktury. Chromatografie a elektroforéza se používají k hodnocení primární struktury velkých biomolekul, zatímco fluorescenční mikroskopie k hodnocení terciární struktury.²⁴

3.10 Výhody podávání léčiv prostřednictvím nanočástic

Nanočástice mohou být použity jako léčivo, nebo nosič léčiva a tyto nosiče mohou být vyrobeny z mnoha materiálů s unikátní strukturou vhodnou k cílenému doručení léčiva. Léčiva mohou být vpravena do těchto částic různými způsoby, např. enkapsulací, povrchovou úpravou, či zapouzdřením.

Nanočástice, vzhledem k jejich malé velikosti, mohou efektivně proniknout přes bariéry do jednotlivých buněk, což umožňuje efektivní akumulaci léku v cílové buňce. Z tohoto důvodu se nežádoucí vedlejší účinky a toxicita léčiva snižují a naopak terapeutický efekt se zvyšuje.^{7, 23}

Nanotechnologie ve farmaceutickém odvětví biotechnologie slouží ke zlepšení terapeutického indexu léčiva a poskytuje řešení problémů s doručením nových a připravovaných biotechnologických produktů, jako jsou rekombinační proteiny a oligonukleotidy. Otevírají se nové možnosti pro léčebné prostředky, které nemohou

být efektivně použity jako klasické lékové formy kvůli špatné biologické dostupnosti, nebo nestabilitě léčiva.

3.11 Klinicky užívané nanodisperze

Nanočástice nabízí specifické výhody oproti konvenčnímu podávání, jako je nízké dávkování, specifické zaměření, nižší cytotoxicita. Nanočástice jsou relativně vysoce stabilní, enkapsulují hydrofilní i hydrofobní látky, a jsou velmi vhodné pro všechny cesty podání (perorální, inhalační, ...), nanočástice umožňují postupné uvolňování léčiva z polymerní matrice. Tyto jejich vlastnosti podporují zlepšení biologické dostupnosti léčiv, snižují frekvenci dávkování a řeší i problém nedodržování předepsané léčby díky zvýšené compliance pacienta.

Použití nanočástic jako nosičů léčiv může snížit toxicitu léčiv. Nicméně, některé skupiny nanočástic mají za následek nepříznivé reakce organismu. U pomalu rozložitelných nebo nerozložitelných nanočástic může docházet ke kumulaci částic, což v konečném důsledku může způsobit chronickou zánětlivou odpověď. Kationaktivní částice (včetně Au a polystyrenových), jsou příčinou hemolýzy a srážení krve. Anionaktivní částice jsou obvykle spíše netoxické.²³

3.12 Nanočástice značené fluorescenčním barvivem

Chromeon 470 (PD-Chromeon 470)

PD je nový polymer, který je odolnější vůči kyslíku a je fotostabilnější oproti latexovým částicím. PD nanočástice značené fluorescenčním barvivem Chromeon využívají novou formu zesíťovaného polymeru k zapouzdření tohoto barviva o vysoké intenzitě, čímž umožňují měření s vyšší citlivostí.

Tyto fluorescenčně značené nanočástice jsou vhodné ke značení proteinů a k detekci reakcí antigen-protilátka.

Uchovávají se při teplotě 2-8 °C.^{27, 28}

3.13 Fluorimetrie

Při fluorimetrii se využívá fotoluminiscence. Látka ve vzorku absorbuje elektromagnetické záření (primární excitační záření) o určité vlnové délce, které způsobí, že některé valenční elektrony se dostanou do vyšší energetické hladiny (excitace). Při návratu do základního stavu se část této nabitě energie vyzáří ve formě tepla a část se emituje ve formě fotonu (sekundární záření). Intenzita tohoto světla je pak přímo úměrná koncentraci látky ve vzorku. Emitované záření má vždy menší energii (vyšší vlnovou délku) než excitační záření, které vyvolá fotoluminiscenci.

Rozeznávají se dva typy fotoluminiscence:

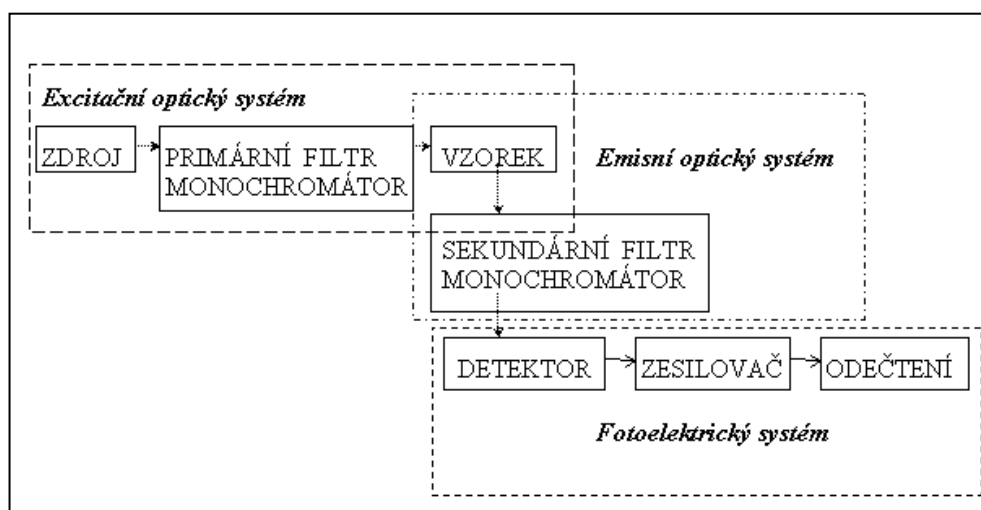
Fluorescence – kdy látka emituje záření jen po dobu působení primárního záření

Fosforescence – látka emituje záření i po skončení působení primárního záření

Nevýhodou je nestabilita fluorescenčních činidel, které jsou citlivé např. na změny pH, přítomnost oxidačních činidel, či tzv. zhášeců, což jsou látky, které způsobí sestup excitovaného elektronu do základní hladiny bez vyzáření fotonu, dále na změnu polaritu či iontové síly.^{29,30}

Přístroj pro měření fluorescence je označován jako fluorimetr. Pokud se jím dají měřit excitační i emisní spektra, bývá název upřesněn na spektrofluorimetr.

Zdroj vysílá excitační záření, z něhož se filtrem či monochromátorem izoluje takové rozmezí vlnových délek, aby došlo k excitaci vzorku. Tato část záření dopadá na vzorek a vyvolává v něm fluorescenční záření. Jen část tohoto záření pak prochází druhým (emisním) filtrem a dopadá na fotoelektrický detektor, kde vyvolá elektrický signál, který je dále zesilován a měřen.³¹



Obrázek č. 8: Schéma sestavení fluorimetru³¹

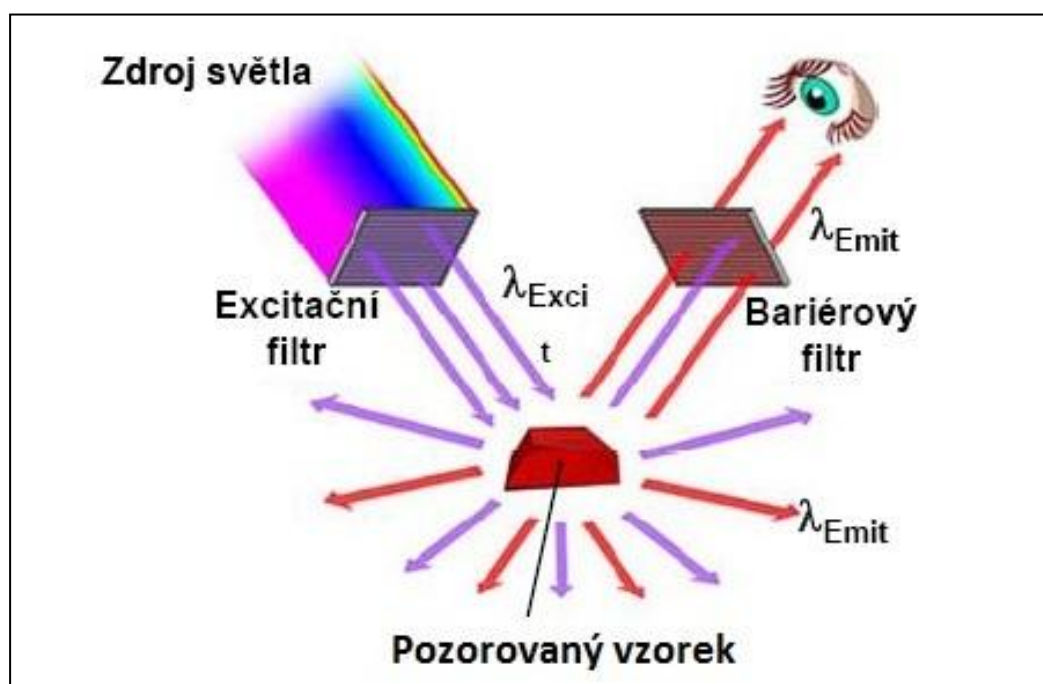
3.14 Fluorescenční mikroskopie

Fluorofor je látka, která absorbuje světlo o určité vlnové délce a následně je schopna emitovat světlo delší vlnové délky. Tyto látky pak lze pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu. Velice se podobá světelnému mikroskopu, ale navíc musí mít velice silný zdroj světla a také dva typy filtrů.³²

Tyto filtry umožňují pozorování emisního záření, jehož intenzita je mnohem nižší, než u záření excitačního.

Excitační filtr propouští pouze část barevného spektra, která je nutná pro excitaci a také nepropouští světla podobných vlnových délek, jako je světlo emisní z důvodu nevhodného zabarvení pozadí. Tento filtr je v mikroskopu umístěn mezi zdroj světla a pozorovaný vzorek.

Bariérový filtr propouští pouze tu část spektra, kterou vzorek emitoval a brání průchodu světla excitačního, protože je mnohem silnější než světlo emisní, které by nebylo lidským okem rozlišitelné. Tento filtr je umístěn mezi vzorkem a objektivem.^{31, 33}

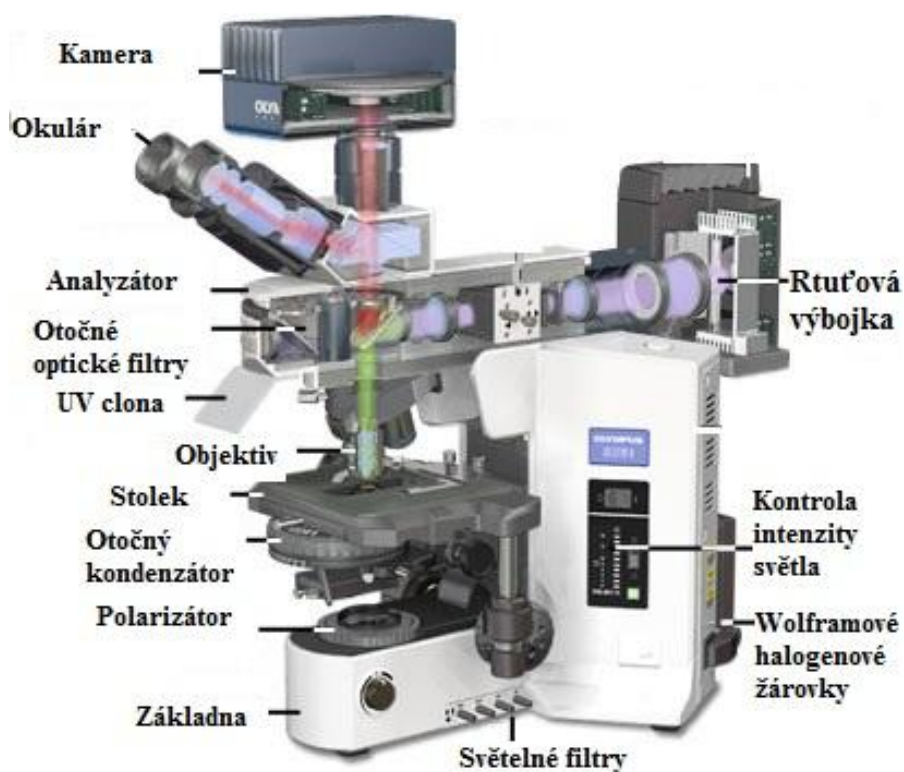


Obrázek č. 9: Princip bariérového a excitačního filtru³⁴

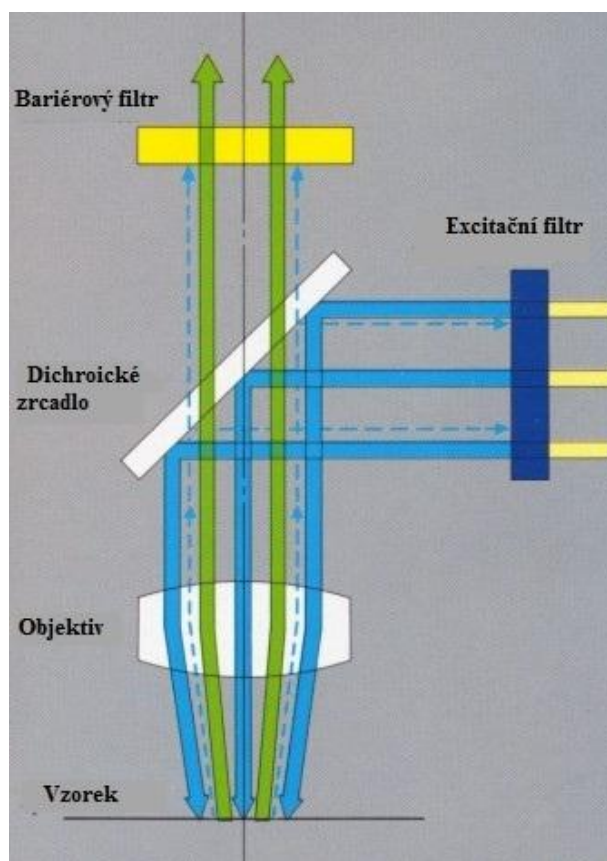
Jako zdroj světla se u fluorescenčních mikroskopů používá rtuťová výbojka. Podle uspořádání jednotlivých částí se mikroskopy dělí na dva druhy.

Transmisní fluorescenční mikroskop (Transmission light fluorescence microscope) - u tohoto typu prochází světlo excitačním filtrem a na vzorek přichází zespodu, stejně jako u mikroskopu světelného. K osvětlení preparátu se namísto klasického kondenzátoru používá kondenzátor zástinový, který způsobí, že světlo dopadá na preparát z boku. Do objektivu se tak dostane pouze emitované světlo.^{32, 33}

Epifluorescenční mikroskop (Reflected light fluorescence microscope) - u tohoto typu prochází excitační záření objektivem a na preparát dopadá shora. Emitované světlo se pak vrací zpátky do objektivu. Je nutné zde použít zrcadlo, které odráží maximum excitačního světla do objektivu a zároveň propouští maximum emitovaného světla do okuláru. Používají se proto dichroická zrcadla, která odráží světlo podle jeho vlnové délky. U tohoto typu mikroskopu se kombinace dichroického zrcadla a obou filtrů vkládá do mikroskopu jako tzv. kostka, kterou lze měnit podle použitého fluorochromu.^{32, 33}



Obrázek č. 10: Epifluorescenční mikroskop³⁵



Obrázek č. 11: Princip dichroického zrcadla³⁶

3.15 DLS^{37, 38, 39}

Zetasizer Nano ZS umožňuje měřit tři nejdůležitější parametry polymerních sloučenin a koloidů a to velikost částic a molekul v rozmezí 0,3 nm - 10 μm, zeta potenciál v nevodných a vodných disperzích a molekulovou hmotnost.

Výhodou tohoto přístroje je, že umožňuje také měření vzorků neředěných nebo jen malým naředěním.

K měření těchto vlastností částic využívá neinvazivní metodu dynamického rozptylu světla (DLS - dynamic light scattering), někdy označovanou jako foton korelační spektroskopie (PCS - photon correlation spectroscopy) nebo také kvazielastický rozptyl světla (QELS - quasi-elastic light scattering).

Základem metody DLS je měření fluktuace intenzity laserového světla, které se rozptýlí na nestacionárních částicích dispergované fáze podléhajících Brownovu pohybu.

Rozptyl je fyzikální jev, kdy jsou pohybující se částice odchylovány z přímé dráhy vlivem prostředí, jímž prochází. Při Rayleighově rozptylu, kterého využívá právě DLS, jsou částice, na kterých dochází k rozptýlení záření, mnohem menší než vlnová délka použitého záření, což způsobuje, že intenzita rozptýleného světla je izotropní, tedy ve všech směrech stejná. Lze tedy provádět měření v jednom úhlu pro stanovení intenzity rozptýleného záření. Používá se snímání intenzity světla v úhlu 90° nebo nověji ve „zpětném“ (backscatter) úhlu 173°, což se používá u měření koncentrovanějších vzorků k potlačení vlivu vícenásobného rozptylu světla.

Intenzita rozptýleného světla je přímo úměrná velikosti částice a nepřímo úměrná vlnové délce světla použitého laseru.

Brownův pohyb je náhodný pohyb částic způsobovaný nárazy molekul rozpouštědla. Na větší částice mají molekuly rozpouštědla menší vliv, tudíž i Brownův pohyb je pomalejší. Naopak je tomu u menších částic.

DLS měří tento pohyb a určuje z něj velikost částic. Velikost Brownova pohybu se určuje jako difúzní koeficient.

Difúzní koeficient je nepřímo úměrný velikosti částice a závisí na teplotě a viskozitě prostředí. Tento vztah můžeme vyjádřit pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice.

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d}$$

η - viskozita rozpouštědla (voda při 24,85°C = 8,94 x 10⁻⁴ Pa.s)

T - teplota (pokojová teplota = 298 K)

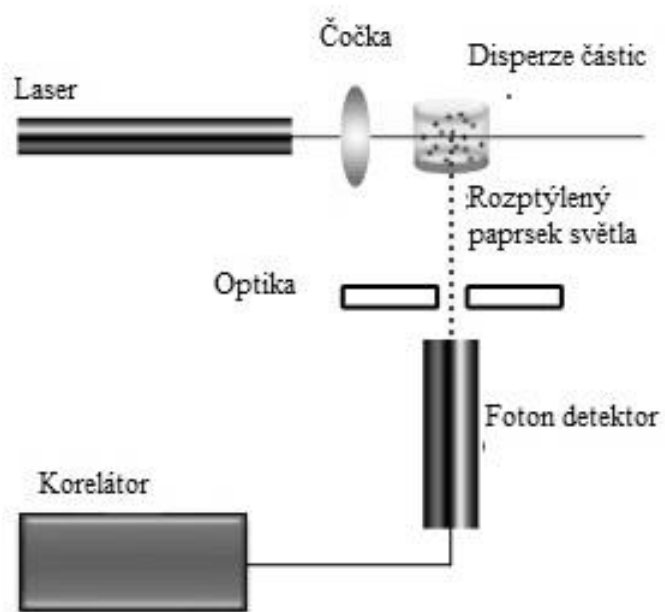
D - difúzní koeficient (m²/s)

k_B - Boltzmannova konstanta (1,3807 x 10⁻²³ J/K);

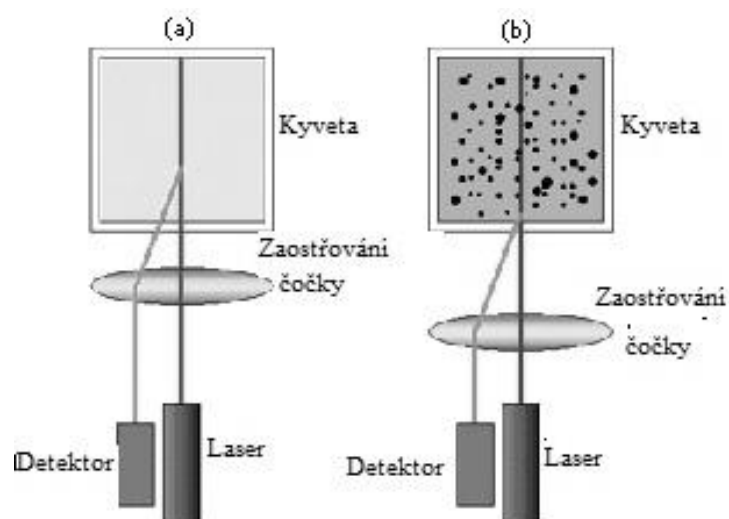
d – hydrodynamický průměr (m), tj. 2 x R_h

Proto je pro měření DLS nutné přesně znát teplotu a viskozitu disperzního prostředí.

Velikost částic pomocí DLS se určuje jako hydrodynamický poloměr, což je aproximace skutečného tvaru částice na tvar koule o takovém rozměru, aby tato koule vykazovala stejný difúzní koeficient jako měřená částice.



Obrázek č. 12: Schéma sestavení DLS - snímání intenzity světla v úhlu 90° ⁴⁰



Obrázek č. 13: Snímání intenzity světla při zpětném úhlu 173°

Zetasizer Nano ZS umí automaticky nastavit pozici měření v kyvetě podle množství, velikosti a koncentrace měřených částic.

- a) Malé částice nebo malá koncentrace ve vzorku
- b) Velké částice nebo velká koncentrace ve vzorku ⁴¹

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Suroviny a materiál

SUROVINY	VÝROBCE (či DODAVATEL)
Nano beads based od PD, Chromleon 470-marked	Sigma-Aldrich, Praha, ČR
Voda pro injekce (ČL 2009 Aqua pro injectione)	Ardeapharma a.s., Ševětín, ČR
Orion application solution pH 7.00 Buffer	Thermo electron corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Orion application solution pH 10.01 Buffer	Thermo electron corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (ČL 2009 Natrii dihydihydrogenphosphas dihydricus)	Dr. Kulich Pharma s.r.o, Hradec Králové, ČR
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (ČL2009 Natrii hydrogenphosphas dodecahydricus)	Dr. Kulich Pharma s.r.o, Hradec Králové, ČR
Chlorid sodný (ČL 2009 Natrii chloridum)	Penta Ing. Petr Švec, Praha, ČR
Voda čištěná (ČL 2009 Aqua purificata)	FaF UK, Hradec Králové, ČR

4.2 Přístroje

PŘÍSTROJE	VÝROBCE
Minitřepačka MS3 digital	IKA®-Works, Inc., Wilgmington, USA
DLS – Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd, Anglie
Digitální pH-metr GRYF 209L	Elektronické přístroje, Havlíčkův Brod, ČR
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje, Praha, ČR
pH elektroda HC 113	THETA 90, Praha, ČR
Předvážky Kern 440-45N	Kern & Sohn, Balingen, Německo
Kombinovaná lednička s mrazničkou Frigera D118702	Liebherr, Ochsenhausen, Německo
Ohmmetr 41R	CHY, Taiwan
Vodní lázeň Grant JB5 series	Grant, Anglie
Analytické váhy Pioneer TM PA 430	Ohaus, Pine Brook, New Jersey
Centrifuga EBA 20	Hettich, Beverly, Massachusetts, USA
Luminiscenční spektrometr, Aminco- Browman® Series 2, FA-357	Thermo electron corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Tokyo, Japan

Sestava pro mikroskop:

Mikroskop Olympus BX51
 Zdroj Olympus U-RFL-T
 Rtuťová lampa U-LH100HGAP0
 Digitální kamera Olympus DP72
 WIB filtr U-UWIB3

4.3 Pomůcky

POMŮCKY	VÝROBCE (dodavatel)
DLS plastové kyvety 12,5x12,5x45 mm	Brand, Německo
Parafilm „M“	Brand, Německo
Bakteriální filtr Millex [®] GP (Milli pore Express [®] PES membráně)	Millipore, Carringtonwohill, Ireland
Plastová stříkačka 5ml	Chirana Group a.s., Praha, ČR
Kyvety (luminiscenční spektrometr) 10 mm	Starna scientific Ltd, UK (Chromspec s.r.o, Mníšek, ČR)
Vialky šroubovací ND13 4ml	Fisher Scientific, Pardubice, ČR
Pipety Transferpette [®] S (2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Brand, Německo
Franzovy cely	FaF UK, Hradec Králové, ČR
Laboratorní sklo	FaF UK, Hradec Králové, ČR

4.4 Biologický materiál

Pro permeační pokusy byly jako modely lidské sublinvální membrány použity prasečí jazyky. Tento materiál byl získáván z prasete domácího *Sus strofa f. domestica*.

Potřebnou membránu poskytuje pouze spodní část jazyka. Jazyky proříznuté, či jinak poškozené na preparované straně nemohly být jako membrány pro permeaci použity.

Postup získání potřebného materiálu spočívá v odříznutí sublinvální membrány od celistvého jazyka s malým množstvím svaloviny. Následně byla zbylá svalovina opatrně odstraněna pomocí skalpelu, přičemž nesmělo dojít k protržení či jinému poškození membrány, která by pak pro budoucí permeační pokusy již nebyla vhodná.

4.5 Měření velikosti nanočástic v disperzi pomocí DLS

Pomocí přístroje Malvern - Zetasizer Nano ZS byla změřena velikost nanočástic v disperzi a to tak, že určité množství disperze bylo rozptýleno ve vhodném mediu přímo v kyvetě pro měření. Pokud byl médiem pufr, množství potřebné pro přípravu vzorku bylo přefiltrováno do kyvety pomocí bakteriálního filtru (velikost pórů 0,22 μm). Kyvety s připraveným vzorkem byly následně uzavřeny Parafilmem a vzorky zhomogenizovány prostřednictvím minitřepačky.

Rozpis složení vzorků

Vzorek	Disperze nanočástic	Médium (1 ml)
1	20 μl	Aqua pro injectione
2	20 μl	Pufr dle Sørenseny pH 7,4
3	20 μl	Pufr dle Sørenseny pH 6,6

4.6 Pozorování nanočástic pomocí fluorescenčního mikroskopu

Základní vzorek disperze nanočástic pro fluorescenční mikroskopii byl připraven naředěním 20 μl disperze nanočástic (Nano beads based od PD, Chromeon 470-marked, Sigma-Aldrich) v 1 ml Aqua pro injectione. Zředěný vzorek disperze nanočástic pro fluorescenční mikroskopii byl připraven naředěním základního vzorku Aqua pro injectione v poměru 1:4.

Preparát byl připraven kápnutím vzorku na podložní sklíčko a překrytím krycím sklíčkem, přebytečná tekutina byla odstraněna pomocí buničiny, případně byl preparát poté ještě zafixován nanesením průhledného laku na nehty na okraje krycího sklíčka.

Pro pozorování při 1000x zvětšení bylo třeba použít imerzní olej.

4.7 Měření pH disperze nanočástic

Měření pH disperze nanočástic bylo provedeno pomocí pH metru GRYF 209L s pH elektrodou HC 113. Před měřením byla provedena kalibrace pomocí pufrů o pH 7 a pH 10. Vlastní měření neředěné disperze nanočástic bylo provedeno tak, že elektroda byla ponořena přímo do disperze nanočástic.

4.8 Příprava pufrů

Pro permeační pokus byly vybrány pufrы o pH 6,6 a pH 7,4.

4.8.1 Fosfátový pufr dle Sörenseny pH 6,6 (500ml)

Složení

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	6,2
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	9,5
Chlorid sodný	4,9
Čištěná voda	ad 1000,0

Přepočet na 500ml

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	3,1
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	4,75
Chlorid sodný	2,45
Čištěná voda	ad 500,0

Příprava

- 1) Nejprve byla před přípravou provedena kalibrace pH metru pomocí kalibračních roztoků.
- 2) V kádince s přibližně 250 ml čisté vody byla rozpuštěna daná množství dihydrogenfosforečnanu sodného a chloridu sodného za použití magnetické míchačky.
- 3) Hydrogenfosforečnan sodný byl rozpuštěn v přibližně 200 ml vody.
- 4) Do roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného byl, za stálého míchání a kontroly pH pomocí pH metru, postupně doléván roztok hydrogenfosforečnanu disodného, dokud nebylo dosaženo požadovaného pH.
- 5) Po dosažení dané hodnoty pH byl vzniklý roztok přelit do odměrné baňky a doplněn vodou na 500 ml.
- 6) Řádně promíchaný výsledný roztok byl uchováván v chladu při 2-6°C.

4.8.2 Fosfátový pufr dle Sørenseny pH 7,4 (1000ml)

Složení

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	2,1
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	19,1
Chlorid sodný	4,4
Čištěná voda	ad 1000,0

Příprava

Při přípravě bylo postupováno shodně, jako při přípravě předchozího pufru s tím rozdílem, že bylo připraveno dvojnásobné množství.

4.9 Permeační pokusy

Permeační pokusy byly prováděny v modifikovaných Franzových celách, které byly umístěny v termostátované vodní lázni vytemperované na 37°C. Vzorky sublingválních membrán byly zafixovány mezi dvě destičky z plexiskla namazané silikonovým tukem pro dokonalé přilnutí.

Čerstvé sublingvální membrány byly okamžitě po separaci svaloviny konzervovány ponořením do fyziologického roztoku s azidem sodným, přičemž některé z nich byly poté na 1 hodinu zmrazeny.

Cely byly naplněny akceptorovou fází (fosfátový pufr dle Sørenseny pH 7,4), která byla rovněž vytemperovaná na 37°C. Každá cela byla naplněna akceptorovou fází pomocí injekční stříkačky o objemu 20ml. Přebytek fáze ve stříkačce byl umístěn do kalibrované zkumavky, kde byl následně odečten přesný objem. Do svrchní části cely bylo nanášeno mikropipetou 400 μ l fosfátového pufru dle Sørenseny pH 6,6. Následně byl ohmmetrem 41R změřen elektrický odpor membrány, aby byla ověřena nepoškozenost membrán. Poté byl pufr z donorové části odsán mikropipetou a membrána byla dosušena pomocí gázy. Poté bylo mikropipetou nanášeno 100 μ l neředěné disperze nanočástic (Nano beads based on PD, Chromeon 470-marked, Sigma-Aldrich) na zkoušenou membránu do předem vymezeného pole o známé ploše (1 cm²). Úplnost sestavy byla doplněna vložením krycího sklíčka na vrchní plexisklo se vzorkem.

Vzorky akceptorové fáze v množství 0,7 ml byly odebírány v předem stanovených časových intervalech, tzn. po 1; 4; 7; 18; 24 hodinách

(od nanesení disperze nanočástic). Odebraný objem byl poté znovu doplněn novou, předem vytemperovanou akceptorovou fází. Vzorky ve vialkách pak byly uloženy v chladu v lednici o teplotě 2-6°C

Tato diplomová práce se týká vzorků č. 7-18 z druhého permeačního pokusu (2P). První permeaci (1P) a vzorky č. 1-6 z druhé permeace (2P) zpracovala ve své diplomové práci Pavlína Dvořáková.⁴²

4.10 Příprava kalibračních vzorků

Základní disperze nanočástic byla připravena naředěním 10 µl disperze nanočástic (Nano beads based on PD, Chromeon 470-marked, Sigma-Aldrich; 0,5%) ve 100 ml akceptorové fáze (fosfátový pufr dle Sørensen pH 7,4). Jejím ředěním akceptorovou fází byla připravena řada kalibračních vzorků.

Složení jednotlivých kalibračních vzorků

Standard (% zákl. vz.)	Základní disperze (ml)	Akceptorová fáze (ml)	Koncentrace (mg/100 ml)
0	0	4,0	0
10	0,4	3,6	0, 005
20	0,8	3,2	0, 010
30	1,2	2,8	0, 015
40	1,6	2,4	0, 020
50	2,0	2,0	0, 025
60	2,4	1,6	0, 030
70	2,8	1,2	0, 035
80	3,2	0,8	0, 040
90	3,6	0,4	0, 045
100	4,0	0	0, 050

4.11 Měření kalibračních vzorků a odebrané akceptorové fáze z permeačních pokusů

Množství nanočástic v odebraných vzorcích bylo stanoveno pomocí luminiscenčního spektrometru Aminco-Browman® Series 2.

Vhodné nastavení a podmínky měření (viz dále) byly převzaty z pokusů, jež prováděl v rámci své diplomové práce Josef Janečka.⁴³

Nastavení luminiscenčního spektrometru:

Excitační vlnová délka: 470 nm \pm 5 nm

Emisní vlnová délka: 600 nm

Citlivost měření: 1275

Rychlost měření: 5 nm/s

Počet cyklů: 25

Za stejných podmínek byly měřeny i kalibrační vzorky. Pro každý vzorek odebrané akceptorové fáze byly provedeny dvě měření, u každého kalibračního vzorku minimálně tři měření. Získaná data při zpracování výsledků byla zprůměrována.

Na základě hodnot získaných z kalibračních vzorků byla pomocí lineární regrese sestrojena kalibrační přímka.

Hodnoty koncentrací nanočástic v odebraných vzorcích akceptorové fáze byly pomocí šablony pro zpracování výsledků z permeačních pokusů v programu Microsoft Excel⁴⁴ korigovány na odebraný objem. Protokoly výsledků zpracované touto šablonou⁴⁴ jsou součástí **kapitoly 5-DOKUMENTACE**.

4.12 Pozorování vzorků ve fluorescenčním mikroskopu

Pomocí fluorescenční mikroskopie byly pozorovány odebrané vzorky akceptorové fáze a dále i sublingvální membrány použité v permeačním pokusu. Preparáty akceptorové fáze byly připraveny stejným způsobem, jako u pozorování disperze nanočástic (**kapitola 4.6**), tedy kapka vzorku překrytá krycím sklíčkem a zafixována lakem na nehty.

Sublingvální membrána byla vždy omyta destilovanou vodou a na podložní sklíčko byla přenesena její část, která byla vymezena pro permeaci nanočástic. Preparát byl pozorován bez krycího sklíčka.

5 DOKUMENTACE⁴⁴

Protokol 7

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,8$

Membrána: 14.9.2011

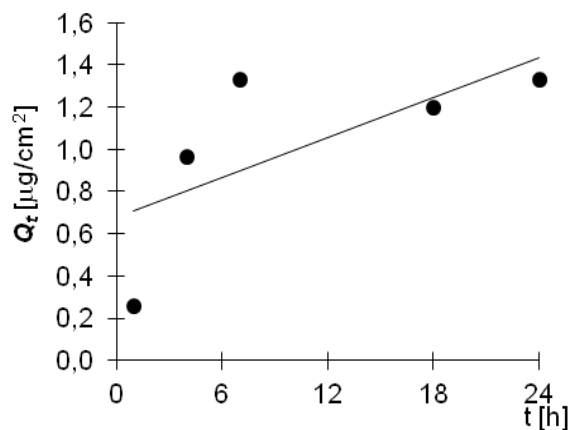
Azid sodný

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,002	0,7	0,002	0,3	0,3
4	0,006	0,7	0,006	1,0	1,0
7	0,008	0,7	0,008	1,3	1,3
18	0,007	0,7	0,007	1,2	1,2
24	0,007	0,7	0,008	1,3	1,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	0,3	0,7
4	1,0	0,8
7	1,3	0,9
18	1,2	1,2
24	1,3	1,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,03145$
Abs.	$q = 0,67701$
Korelační koef.	$r = 0,68463$



Protokol 8

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,9$

Membrána: 14.9.2011

Azid sodný

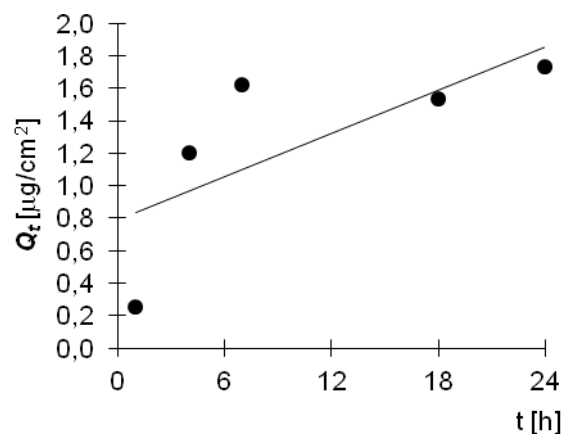
Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,001	0,7	0,001	0,3	0,3
4	0,006	0,7	0,006	1,2	1,2
7	0,008	0,7	0,009	1,6	1,6
18	0,008	0,7	0,008	1,5	1,5
24	0,008	0,7	0,009	1,7	1,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,3	0,8
4	1,2	1,0
7	1,6	1,1
18	1,5	1,5
24	1,7	1,7

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,04451$
Abs.	$q = 0,78765$
Korelační koef.	$r = 0,72456$



Protokol 9

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,7$

Membrána: 14.9.2011

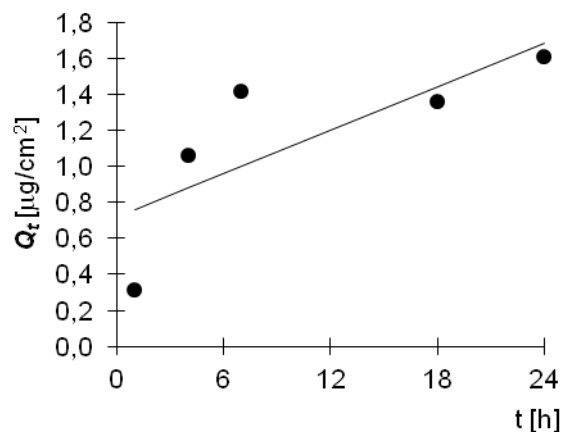
Azid sodný

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,002	0,7	0,002	0,3	0,3
4	0,006	0,7	0,006	1,1	1,1
7	0,008	0,7	0,008	1,4	1,4
18	0,007	0,7	0,008	1,4	1,4
24	0,009	0,7	0,010	1,6	1,6

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	0,3	0,8
4	1,1	0,9
7	1,4	1,0
18	1,4	1,4
24	1,6	1,7

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,04011$
Abs.	$q = 0,71969$
Korelační koef.	$r = 0,7716$



Protokol 10

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Membrána: 14.9.2011

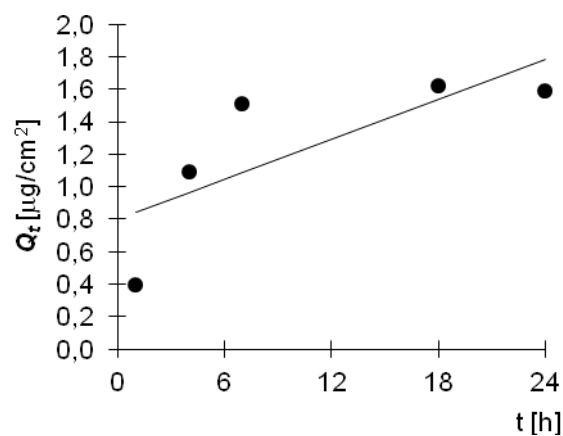
Azid sodný

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,002	0,7	0,002	0,4	0,4
4	0,006	0,7	0,006	1,1	1,1
7	0,008	0,7	0,008	1,5	1,5
18	0,008	0,7	0,009	1,6	1,6
24	0,008	0,7	0,008	1,6	1,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,4	0,9
4	1,1	1,0
7	1,5	1,1
18	1,6	1,5
24	1,6	1,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,04108$
Abs.	$q = 0,79922$
Korelační	$r = 0,77073$



Protokol 11

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,2$

Membrána: 14.9.2011

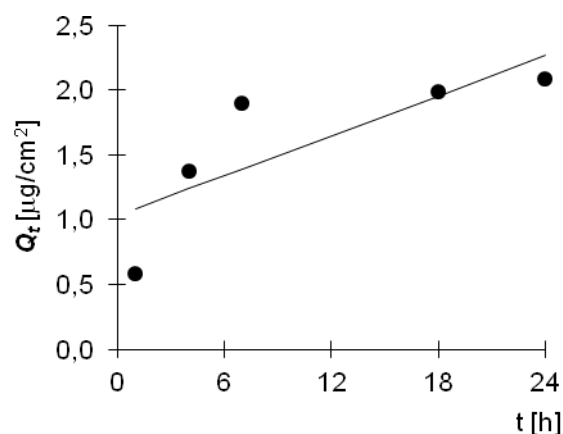
Azid sodný

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,003	0,7	0,003	0,6	0,6
4	0,007	0,7	0,008	1,4	1,4
7	0,010	0,7	0,010	1,9	1,9
18	0,010	0,7	0,011	2,0	2,0
24	0,010	0,7	0,011	2,1	2,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,6	1,1
4	1,4	1,2
7	1,9	1,4
18	2,0	2,0
24	2,1	2,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,05116$
Abs.	$q = 1,03664$
Korelační koef.	$r = 0,80092$



Protokol 12

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,2$

Membrána: 14.9.2011

Azid sodný

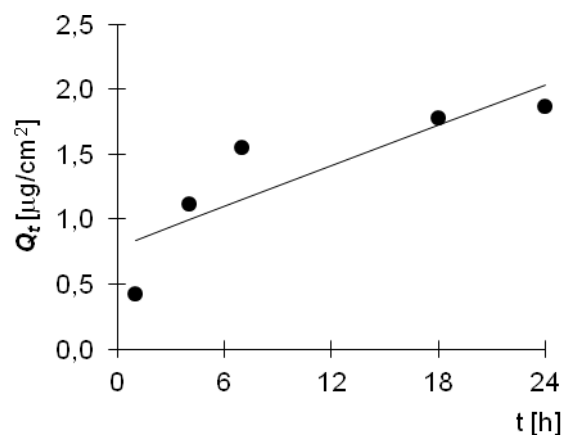
Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,002	0,7	0,002	0,4	0,4
4	0,006	0,7	0,006	1,1	1,1
7	0,009	0,7	0,009	1,6	1,6
18	0,010	0,7	0,010	1,8	1,8
24	0,010	0,7	0,011	1,9	1,9

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	0,4	0,8
4	1,1	1,0
7	1,6	1,1
18	1,8	1,7
24	1,9	2,0

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,05185$
Abs.	$q = 0,78892$
Korelační koef.	$r = 0,85465$



Protokol 13

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,2$

Membrána: 14.9.2011

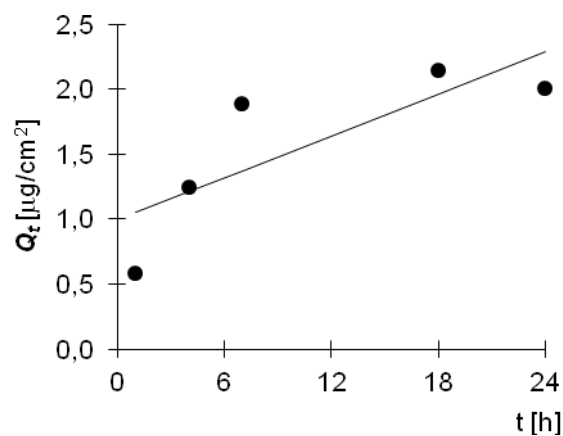
Azid sodný + zmražení

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,003	0,7	0,003	0,6	0,6
4	0,007	0,7	0,007	1,3	1,3
7	0,011	0,7	0,011	1,9	1,9
18	0,012	0,7	0,013	2,2	2,2
24	0,010	0,7	0,012	2,0	2,0

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,6	1,1
4	1,3	1,2
7	1,9	1,4
18	2,2	2,0
24	2,0	2,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,0573$
Abs.	$q = 0,99599$
Korelační koef.	$r = 0,80583$



Protokol 14

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,4$

Membrána: 14.9.2011

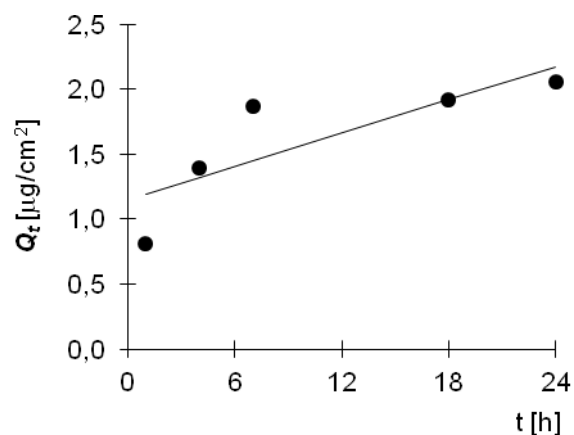
Azid sodný + zmražení

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,005	0,7	0,005	0,8	0,8
4	0,008	0,7	0,008	1,4	1,4
7	0,010	0,7	0,011	1,9	1,9
18	0,010	0,7	0,011	1,9	1,9
24	0,010	0,7	0,012	2,1	2,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,8	1,2
4	1,4	1,3
7	1,9	1,5
18	1,9	1,9
24	2,1	2,2

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,04267$
Abs. člen	$q = 1,15116$
Korelační koef.	$r = 0,82055$



Protokol 15

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17$

Membrána: 14.9.2011

Azid sodný + zmražení

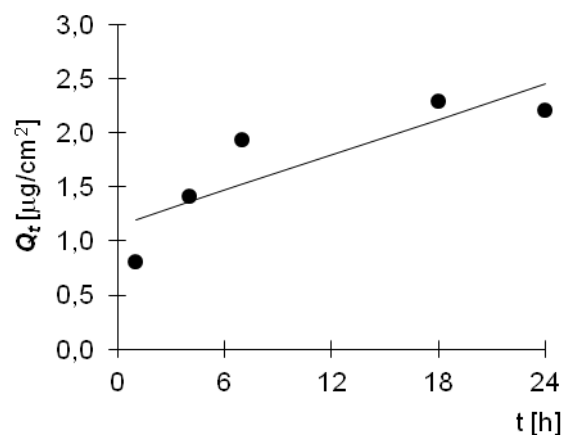
Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,005	0,7	0,005	0,8	0,8
4	0,008	0,7	0,008	1,4	1,4
7	0,011	0,7	0,011	1,9	1,9
18	0,012	0,7	0,013	2,3	2,3
24	0,011	0,7	0,013	2,2	2,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,8	1,2
4	1,4	1,4
7	1,9	1,5
18	2,3	2,1
24	2,2	2,4

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,05419$
Abs. člen	$q = 1,14411$
Korelační koef.	$r = 0,85668$



Protokol 16

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,8$

Mambrána: 14.9.2011

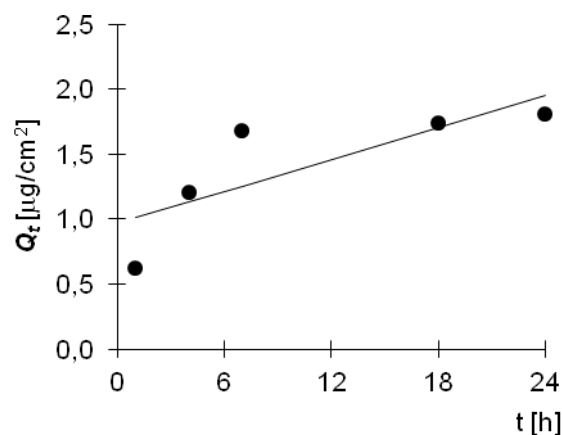
Azid sodný + zmražení

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,003	0,7	0,003	0,6	0,6
4	0,006	0,7	0,006	1,2	1,2
7	0,009	0,7	0,009	1,7	1,7
18	0,009	0,7	0,009	1,7	1,7
24	0,009	0,7	0,010	1,8	1,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	0,6	1,0
4	1,2	1,1
7	1,7	1,3
18	1,7	1,7
24	1,8	2,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,04092$
Abs. člen	$q = 0,96963$
Korelační koef.	$r = 0,80019$



Protokol 17

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,6$

Membrána: 14.9.2011

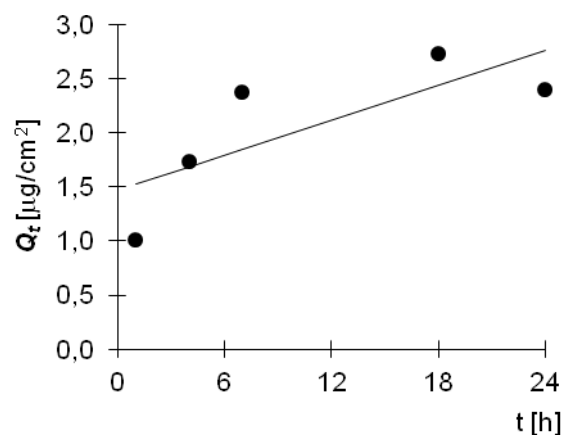
Azid sodný + zmražení

Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,006	0,7	0,006	1,0	1,0
4	0,010	0,7	0,010	1,7	1,7
7	0,013	0,7	0,013	2,4	2,4
18	0,014	0,7	0,016	2,7	2,7
24	0,012	0,7	0,014	2,4	2,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1,0	1,5
4	1,7	1,7
7	2,4	1,8
18	2,7	2,4
24	2,4	2,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 5$
Flux	$J = 0,05358$
Abs. člen	$q = 1,46824$
Korelační koef.	$r = 0,76998$



Protokol 18

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,6$

Membrána: 14.9.2011

Azid sodný + zmražení

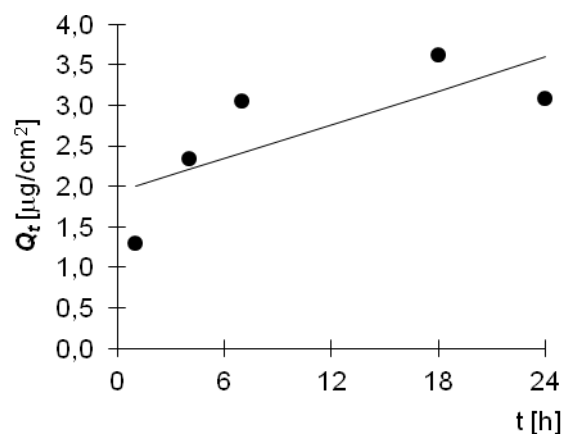
Měření: MP2011-2P

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	0,007	0,7	0,007	1,3	1,3
4	0,013	0,7	0,013	2,3	2,3
7	0,017	0,7	0,017	3,1	3,1
18	0,019	0,7	0,021	3,6	3,6
24	0,015	0,7	0,018	3,1	3,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1,3	2,0
4	2,3	2,2
7	3,1	2,4
18	3,6	3,2
24	3,1	3,6

Parametry regrese

Počet bodů $n = 5$
 Flux $J = 0,06934$
 Abs. $q = 1,93201$
 Korelační koef. $r = 0,75986$



6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Důležitou součástí celé práce bylo zjištění vlastností použitých nanočástic, distribuce jejich velikostí v disperzi, či vliv média na tyto vlastnosti.

Sestava použitá při permeačních pokusech byla již ověřena používáním na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Jako akceptorové medium byl zvolen pufr pH 7,4 dle Sørensen, který představuje fyziologickou hodnotu pH lidské krve (7,36-7,44)⁴⁵. Jako donor byl určen pufr pH 6,6 dle Sørensen, jehož hodnota byla stanovena měřením pH disperze nanočástic. Tato hodnota odpovídá přirozenému pH v dutině ústní člověka (pH 5,8-7,6).⁷

Vybraná analytická metodika (fluorescenční spektroskopie) vyhovuje požadavkům na rychlé a citlivé stanovení množství nanočástic, které pronikly sublingvální membránou.

6.1 pH disperze nanočástic

pH disperze nanočástic bylo změřeno postupem popsáním v **kapitole 4.7**. Výsledná hodnota pH byla 6,65. Podle této hodnoty byl pak připraven donorový pufr.

6.2 Distribuce velikostí částic zjištěná metodou DLS

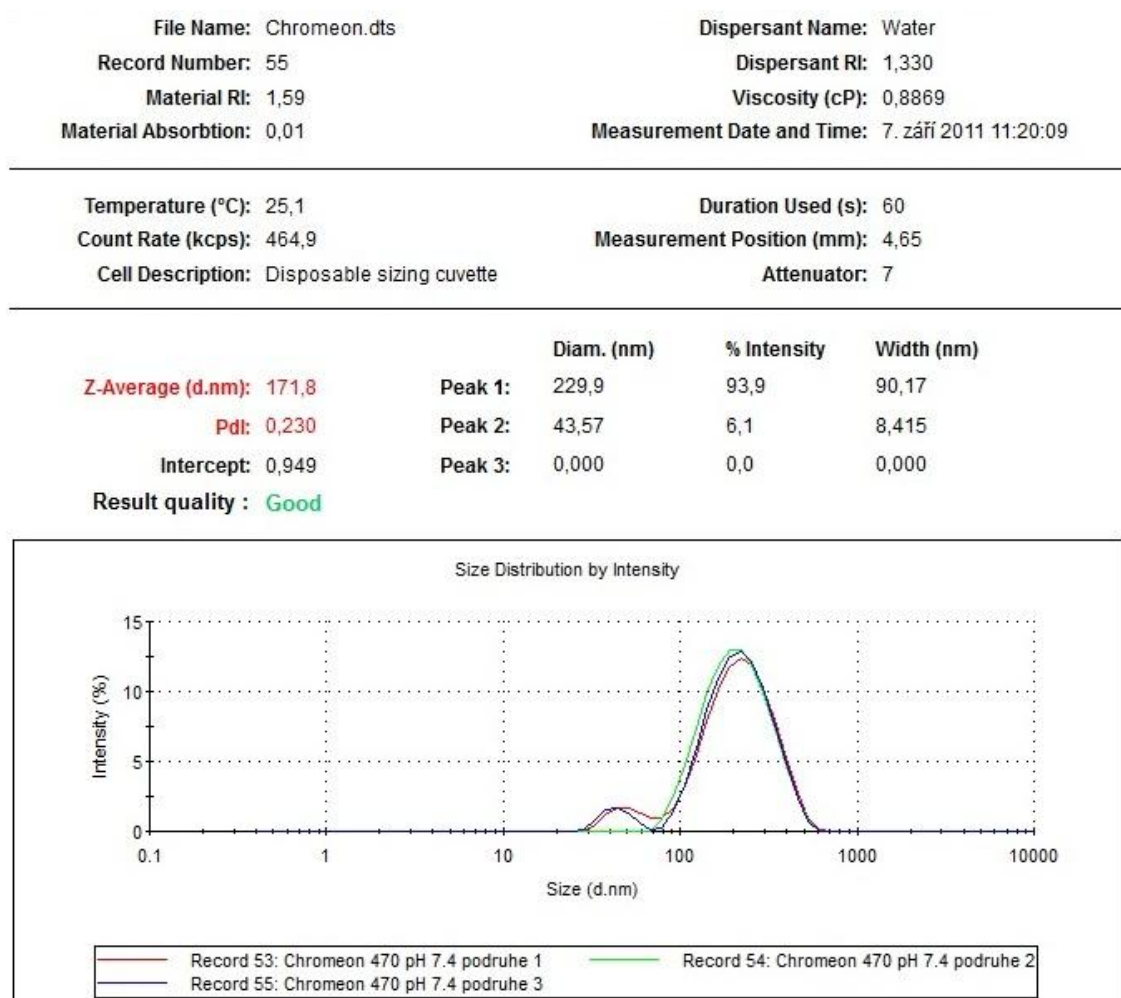
Distribuce velikostí nanočástic byla zjištěna metodou DLS. Bylo také pozorováno, zda se naměřená distribuce velikostí částic změní výměnou media, které bylo použito při permeačních pokusech.

Obrázek č. 14 zobrazuje distribuci velikostí nanočástic v disperzi podle intenzity rozptýleného světla. Tento graf pochází z programu Dispersion Technology Software v5.10 (DTS), kterým byly zpracovány výsledky z DLS.

Ze získaných dat uvedených v **tabulce č.3**, a z názorně sestavených **grafů č. 1-3** vyplývá, že použití rozdílných médií má jen nepatrný vliv na velikost a distribuci velikostí nanočástic ve vzorku.

Díky tomuto zjištění mohlo být při permeačních pokusech přihlédnuto k pH disperze nanočástic a fyziologickým vlastnostem dutiny ústní a byly použity výše zmíněné pufrы, aby bylo co nejblíže napodobeno prostředí *in vivo*.

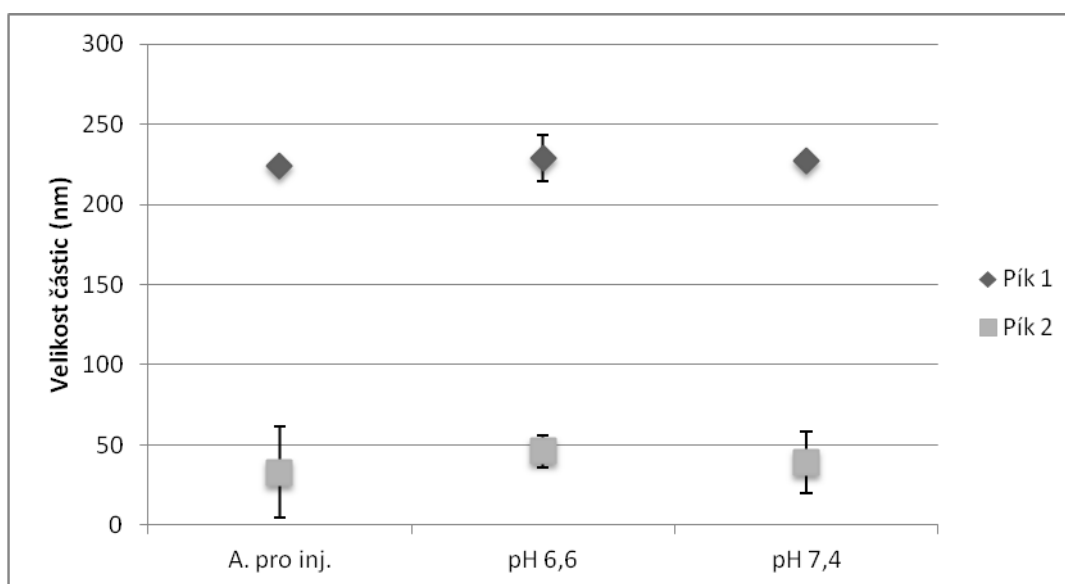
Obrázek č. 14: Distribuce velikostí nanočástic v disperzi podle intenzity rozptýleného světla – Aqua pro injectione



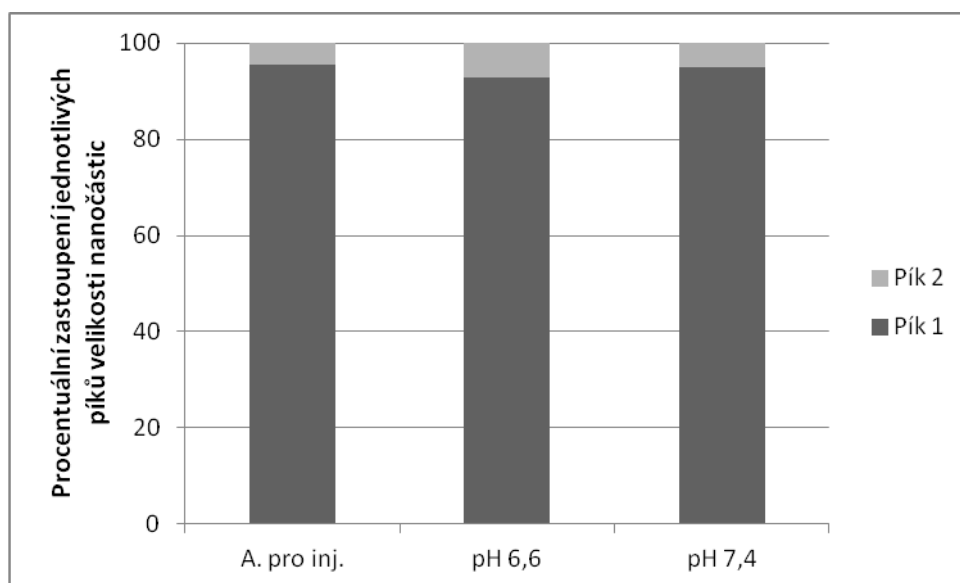
Tabulka č. 3: Výsledné hodnoty distribuce velikostí nanočástic – jejich průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (SD) – Aqua pro injectione; pufr pH 6,6; pufr pH 7,4

Vzorek Chromeon 470	Měření	Z-average d.nm	PdI	Pík 1 d.nm	Pík 2 d.nm	Pík 1 %	Pík 2 %
Aqua pro injectione	1	169,7	0,217	226,0	51,31	92,3	7,7
	2	169,8	0,217	223,8	47,02	93,9	6,1
	3	168,5	0,236	221,5	0,00	100,0	0,0
	<i>průměr</i>	169,3	0,223	223,8	32,78	95,4	4,6
	<i>SD</i>	0,723	0,011	2,250	28,466	4,063	4,063
Pufr pH 6.6 (dle Sörensena)	1	169,1	0,229	224,6	38,80	94,5	5,5
	2	166,4	0,213	217,4	41,98	94,7	5,3
	3	168,1	0,260	245,2	57,12	89,0	11,0
	<i>průměr</i>	167,9	0,234	229,1	45,97	92,7	7,3
	<i>SD</i>	1,365	0,024	14,428	9,789	3,235	3,235
Pufr pH 7.4 (dle Sörensena)	1	171,2	0,257	228,8	47,70	93,5	6,5
	2	168,4	0,233	228,6	49,14	93,6	6,4
	3	166,9	0,236	223,9	42,94	95,4	4,6
	4	170,5	0,237	232,4	49,41	92,9	7,1
	5	169,4	0,219	221,8	0,00	100,0	0,0
	6	171,8	0,230	229,9	43,57	93,9	6,1
	<i>průměr</i>	169,7	0,235	227,6	38,79	94,9	5,1
	<i>SD</i>	1,840	0,012	3,952	19,204	2,642	2,642

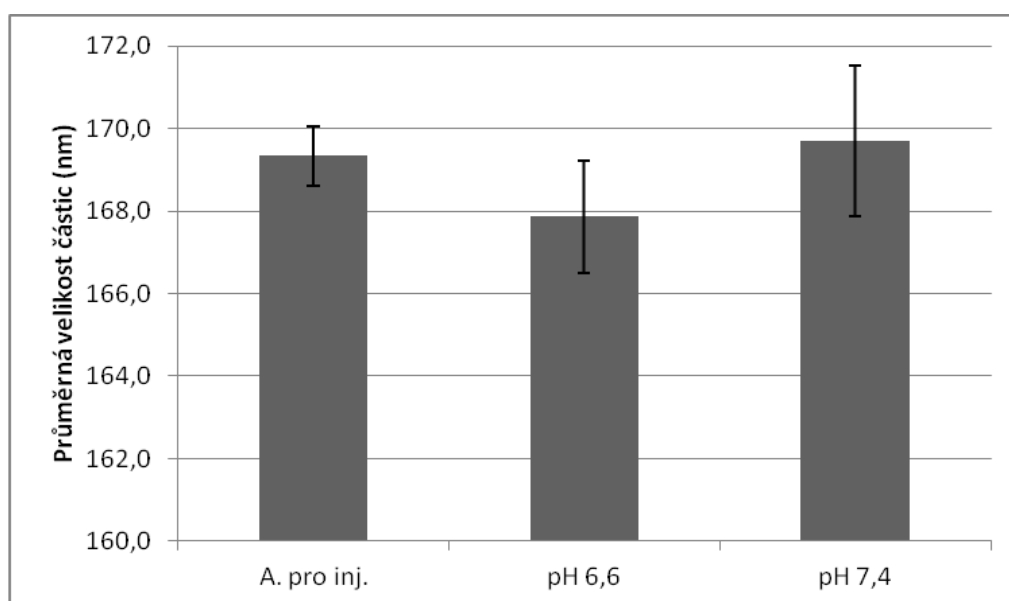
Graf č. 1: Velikost nanočástic – Aqua pro injectione; pufr pH 6,6; pufr pH 7,4



Graf č. 2: Procentuální zastoupení jednotlivých píků velikostí nanočástic podle intenzity
- Aqua pro injectione; pufr pH 6,6; pufr pH 7,4



Graf č. 3: Průměrné hodnoty velikostí nanočástic s jejich směrodatnými odchylkami.
Měřitko osy y v rozsahu 160,0-172,0 nm bylo použito pro zvýraznění rozdílů velikostí nanočástic v jednotlivých médiích - Aqua pro injectione; pufr pH 6,6; pufr pH 7,4



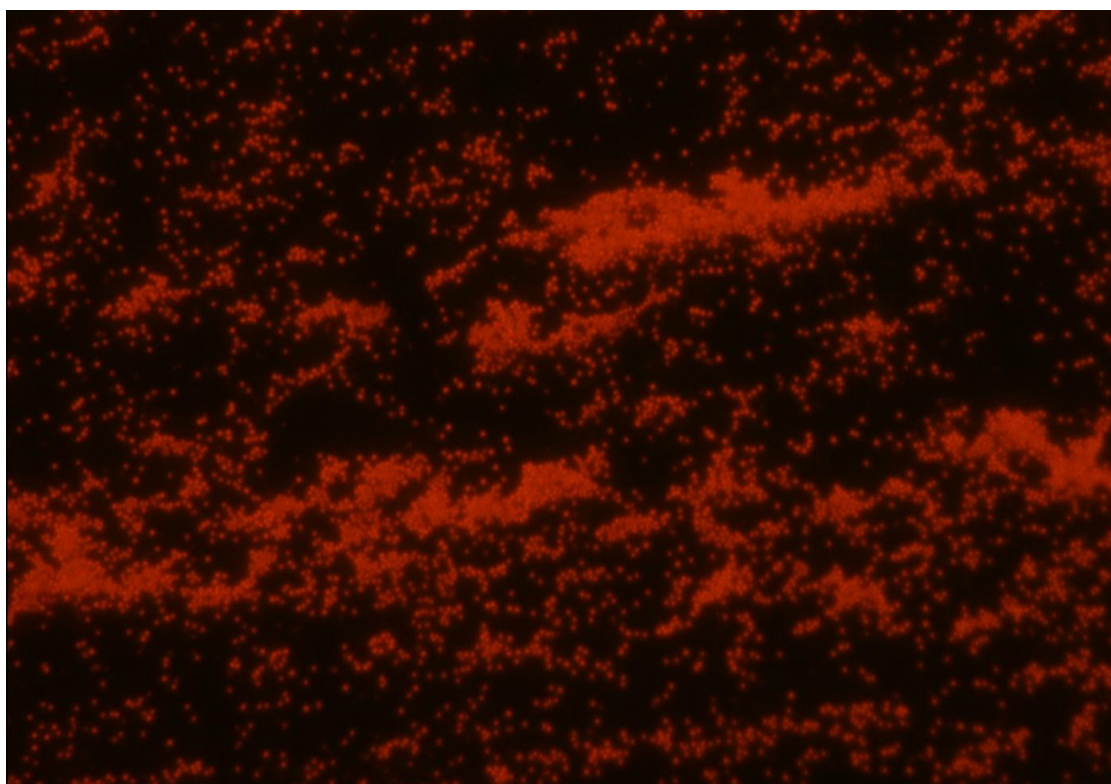
6.3 Pozorování nanočástic pomocí fluorescenčního mikroskopu

Mikroskopické preparáty, připravené postupem popsaným v kapitole 4.6, byly pozorovány a zaznamenány ve formě fotografie či videa. Pozorováno bylo množství nanočástic, jejich charakteristika a chování, což je prezentováno na příkladech, uvedených na následujících obrázcích.

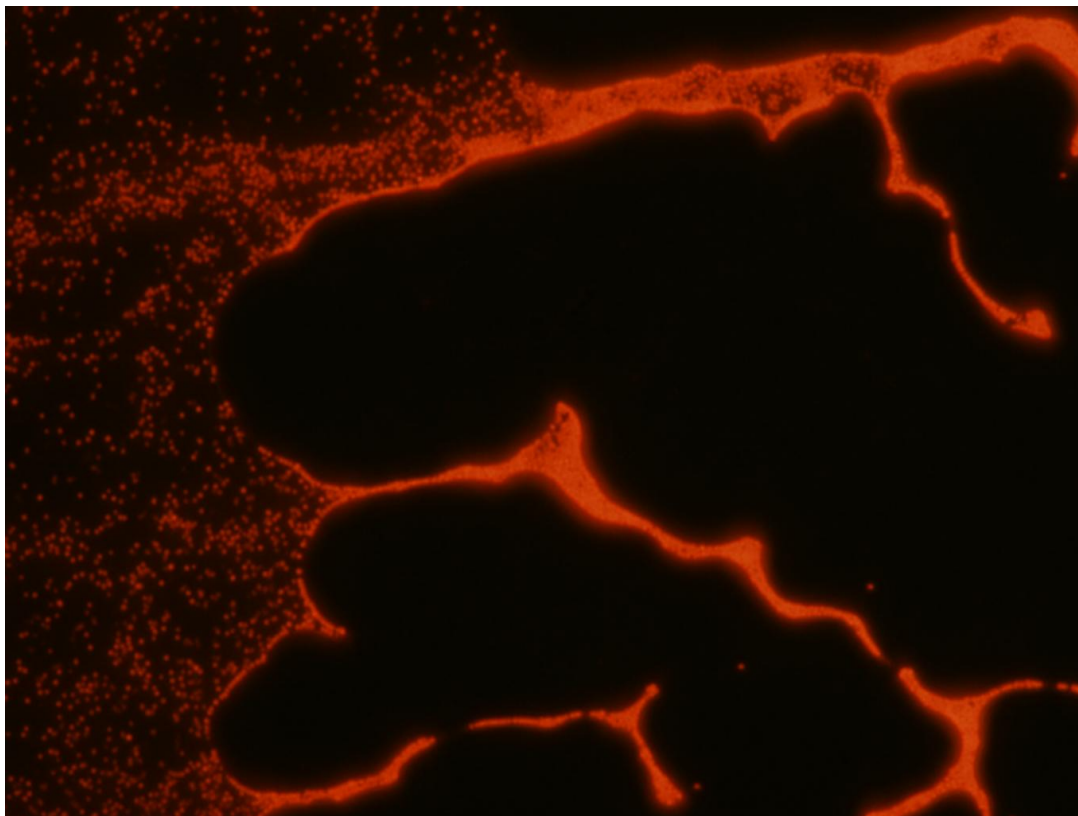
Obrázky č. 15 a 16 představují jeden připravený nezafixovaný preparát, který byl pozorován ihned po přípravě (**obrázek č.15**) a asi hodinu po přípravě (**obrázek č. 16**).

Obrázky č. 17 a 18 představují preparát, který byl při své přípravě zafixován.

Obrázek č. 15: Nanočástice PD-Chromeon 470 – filtr WIB, ISO 400, zvětšení 400x – fotografie z videa 1 v čase 00:02, preparát neředěný a nefixovaný, pozorovaný ihned po přípravě



Obrázek č. 16: Nanočástice PD-Chromeon 470 – filtr WIB, ISO 400, zvětšení 400x – fotografie z videa 3 v čase 00:11, preparát neředěný a nefixovaný, pozorovaný 1 hodinu po přípravě

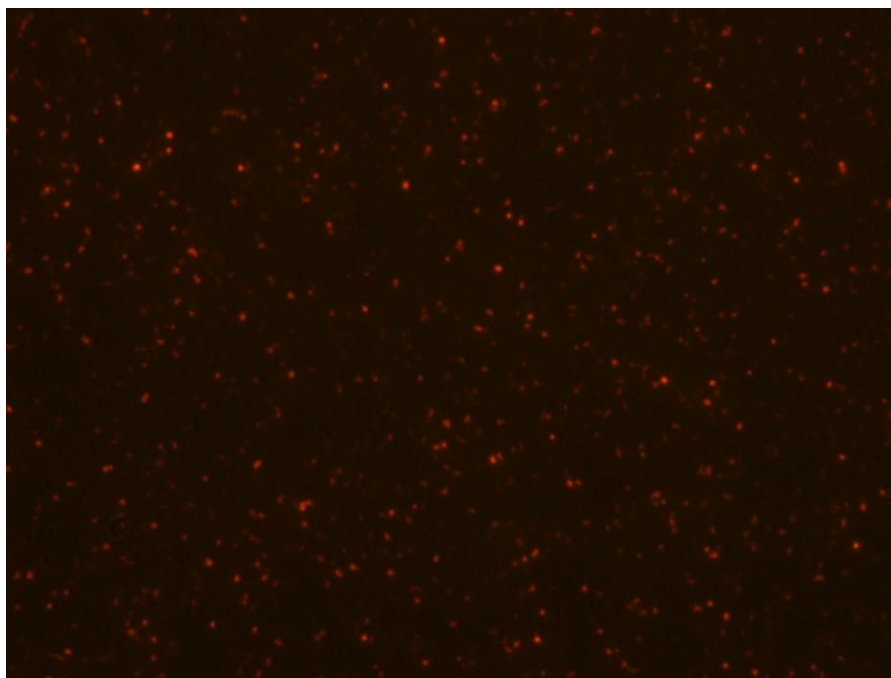


Nanočástice zachycené na **obrázcích č. 15 a 16** konaly při pozorování stálý mihotavý pohyb – Brownův pohyb.

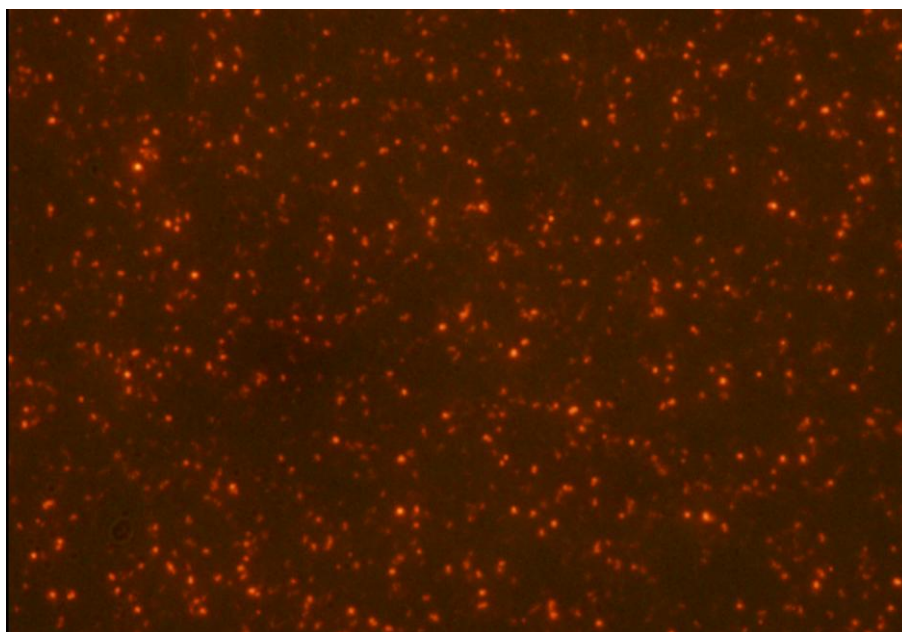
Rychlost Brownova pohybu závisí na velikosti částic.^{37, 38, 39} V našich podmínkách však nebylo možno tuto skutečnost využít k zjištění této charakteristiky. Proto pro měření velikosti nanočástic byla využita metodika DLS.

Jelikož preparát nebyl fixován, docházelo ke schnutí média, což se projevilo shlukováním částic a tvorbou úzkých pásů, jak je vidět na **obrázku č. 16**, pořízeném asi hodinu po přípravě preparátu.

Obrázek č. 17: *Nanočástice PD-Chromeon 470 – filtr WIB, ISO 400, zvětšení 1000x – fotografie z videa 12 v čase 00:05, preparát neřaděný a zafixovaný*



Obrázek č.18: *Nanočástice PD-Chromeon 470 – filtr WIB, ISO 800, zvětšení 1000x – fotografie z videa 10 v čase 00:05, preparát neřaděný a zafixovaný*



Obrázky č. 17 a 18 zobrazují tentýž preparát, jen s jiným nastavením fluorescenčního mikroskopu a také s větším zvětšením, než jaké bylo použito pro pořízení **obrázků 15 a 16**. Částice se opět pohybovaly, preparát nevysychá,

jelikož byl fixován. Fixací preparátu také došlo k zvětšení výšky vrstvy naneseného vzorku, což je na **obrázcích č. 17 a 18** vidět jako výraznější a méně výrazné body.

6.4 Elektrický odpor membrán v permeačním pokusu

Základní myšlenkou vedoucí k měření elektrického odporu membrán, použitých v permeačním experimentu, bylo ověření hypotézy, že čím vyšší bude elektrický odpor membrány, tím hůře přes ni budou nanočástice pronikat.

Tato charakteristika je také důležitá k určení vlastností očištěné membrány. Ne každá membrána byla stejně důkladně očištěna a je zde tedy variabilita v množství zbylé svaloviny na membráně, která by mohla mít na průnik částic také vliv.

Hodnoty elektrického odporu, naměřené postupem uvedeným v **kapitole 4.9**, jsou uvedeny v **tabulkách č. 4 a 5**.

Tabulka č. 4: Výsledky měření elektrického odporu membrán, jejich průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, množství nanočástic⁴⁴, které pronikly za 24 hodin čerstvou membránou zakonzervovanou azidem sodným

Vzorek číslo	Odpor 1 (Ω)	Odpor 2 (Ω)	Odpor 3 (Ω)	Průměr (Ω)	SD (Ω)	$Q_t \text{ (exp)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
7	4200	4221	4222	4214	12	1,3
8	5301	5285	5280	5289	11	1,7
9	2001	2014	2015	2010	8	1,6
10	5291	5294	5285	5290	5	1,6
11	322	308	310	313	8	2,1
12	471	467	466	468	3	1,9

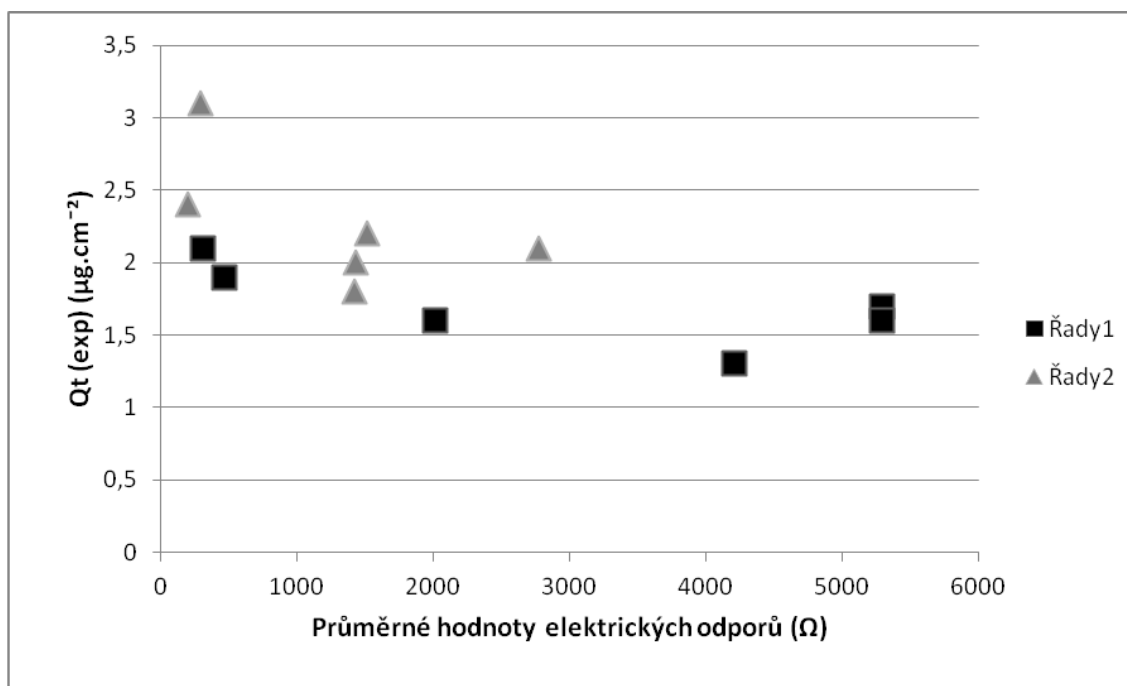
Z hodnot uvedených v **tabulce č. 4** vyplývá, že daná hypotéza zřejmě neplatí, průnik nanočástic sice se stoupajícím odporem klesá, ale poté zase stoupá.

Tabulka č. 5: Výsledky měření odporu membrán, jejich průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, množství nanočástic⁴⁴, které pronikly za 24 hodin čerstvou membránou zakonzervovanou azidem sodným, 1 hodinu zmraženou

Vzorek	Odpor 1 (Ω)	Odpor 2 (Ω)	Odpor 3 (Ω)	Průměr (Ω)	SD (Ω)	$Q_{t \text{ (exp)}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)
13	1440	1430	1428	1433	6	2,0
14	2776	2772	2771	2773	3	2,1
15	1511	1513	1518	1514	4	2,2
16	1426	1418	1414	1419	6	1,8
17	199	206	201	202	4	2,4
18	297	290	284	290	7	3,1

Z hodnot v **tabulce č. 5** také nelze hypotézu jednoznačně potvrdit. Naměřené hodnoty ukazují, že množství nanočástic, které pronikly danou membránou, s velikostí odporu stoupalo (což by byl úplný opak původního předpokladu), ale pouze do hodnoty odporu cca 300 Ω . Dále nastal pokles a mírné zvyšování množství nanočástic, které pronikly danou membránou, spolu se vzrůstajícím odporem.

Graf č. 4: Závislost množství nanočástic, které pronikly membránou, na odporu dané membrány: (■) - body odpovídající hodnotám naměřeným na čerstvé membráně zakonzervované azidem sodným; (▲) - body odpovídající hodnotám naměřeným na čerstvé membráně zakonzervované azidem sodným, na 1 hodinu zmražené



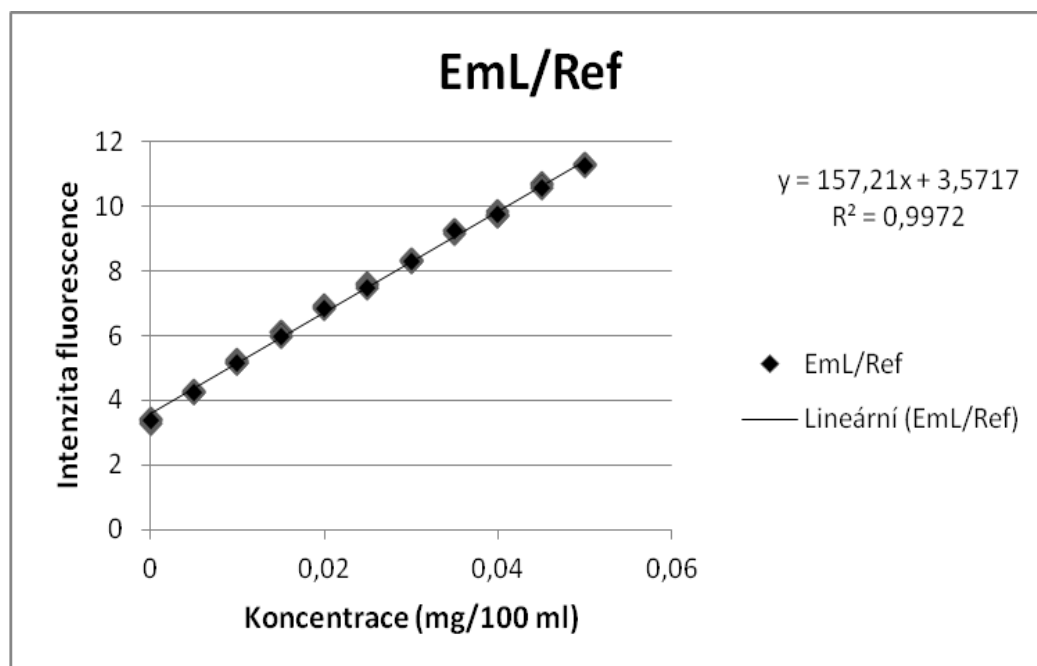
Z **grafu č. 4** vyplývá, že zmražení membrány má jistý vliv na její propustnost. Body odpovídající čerstvé, nezmražené membráně jsou umístěny níže a více vpravo. Množství nanočástic, které těmito membránami pronikly, je tedy nižší a hodnoty elektrického odporu naměřené na těchto membránách jsou vyšší. Je možné se domnívat, že zmražení narušuje určitým způsobem strukturu membrány, která se stává propustnější.

6.5 Kalibrační přímky

Při měření kalibračních roztoků byla zjištěna značná variabilita výsledků. Při dalším pozdějším zkoumání bylo zjištěno, že hodnota slepého vzorku není stálá v čase,⁴³ tudíž je zřejmě třeba proměřovat slepý vzorek častěji, což by vedlo k přesnějším výsledkům. Tyto skutečnosti nám nebyly v době měření známy, proto získané hodnoty z měření jsou méně přesné.

Příčinou této nestability by mohl být vliv teploty již zahřátého přístroje, který měří již delší dobu, či tvorba bublinek ve vzorku. Chyba přístroje byla vyloučena na základě prověření čidla přístroje, které poskytuje stále stejné výsledky. Touto problematikou se podrobně zabýval v paralelně probíhající diplomové práci Josef Janečka.⁴³

Graf č. 5: Kalibrační přímka



Ze čtyř měřených kalibračních přímek byla vybrána k hodnocení výsledků ta (**graf č. 5**), která byla proměřována za podmínek, které se nejvíce podobaly těm, za kterých byly měřeny jednotlivé vzorky z permeačního pokusu.

6.6 Vyhodnocení permeačního pokusu

Vyhodnocení výsledků probíhalo na základě hodnot množství prošlého permeantu $Q_{t(\text{exp})}$ získaných měřeními na spektrofotometru.

Množství nanočástic prošlých sublingvální membránou do akceptorové fáze z donoru za 24 hodin je vyjádřeno jako procentuální část **R** celkového aplikovaného množství nanočástic Q_d dle vzorce:

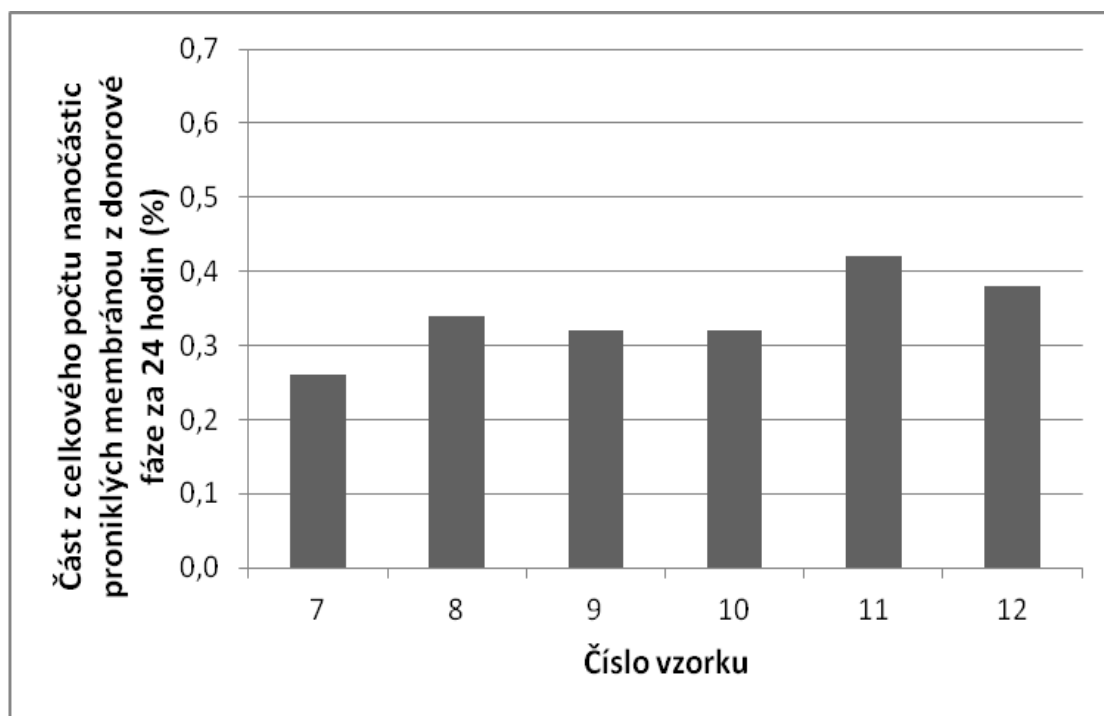
$$R = Q_{t(\text{exp})} / Q_d * 100$$

Získané a vypočtené výsledky jsou obsaženy v následujících **tabulkách č. 6 a 7** a zobrazeny v **grafech č. 6 a 7**.

Tabulka č. 6: Množství nanočástic, které pronikly čerstvou membránou zakonzervovanou azidem sodným za 24 hodin

Vzorek číslo	$Q_{t(\text{exp})}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Q_d (μg)	R (%)
7	1,3	500	0,26
8	1,7	500	0,34
9	1,6	500	0,32
10	1,6	500	0,32
11	2,1	500	0,42
12	1,9	500	0,38
		průměr	0,34
		SD	0,06

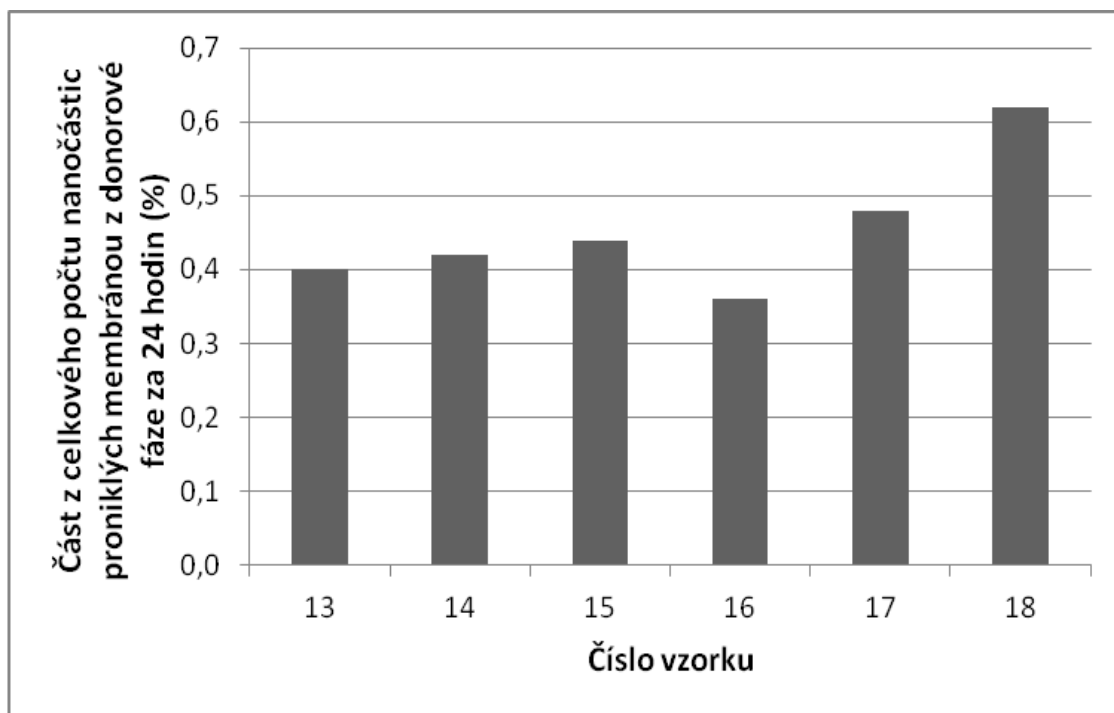
Graf č. 6: Procentuální část **R** nanočástic, které prošly čerstvou membránou zakonzervovanou azidem sodným za 24 hodin, z celkového množství nanočástic v donorové fázi **Q_d**.



Tabulka č. 7: Množství nanočástic, které pronikly čerstvou membránou zakonzervovanou azidem sodným a na hodinu zmraženou za 24 hodin

Vzorek číslo	$Q_{t \text{ (exp)}}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Q_d (μg)	R (%)
13	2,0	500	0,40
14	2,1	500	0,42
15	2,2	500	0,44
16	1,8	500	0,36
17	2,4	500	0,48
18	3,1	500	0,62
průměr			0,45
SD			0,09

Graf č. 7: Procentuální část **R** nanočástic, které prošly čerstvou membránou zakonzervovanou azidem sodným a na 1 hodinu zmraženou za 24 hodin, z celkového množství nanočástic v donorové fázi **Q_d**.



Ze znázorněných **grafů č. 6 a 7** a z uvedených průměrných hodnot v **tabulkách č. 6 a 7** je patrné, že propustnější je membrána, která byla na hodinu zmrazena. Rozdíl sice není markantní, ale mohl by být podstatný, pokud by např. zmrazení trvalo déle. Je možné, že krystalky ledu nějakým způsobem poškozuji strukturu membrány, která je pak více propustná.

Z průběhu permeace (protokoly⁴⁴ v kapitole 5-DOKUMENTACE) lze vyčíst, že množství nanočástic, které pronikly membránou, v první fázi s časem stoupá, ale v druhé fázi (cca po 18 hodinách) stagnuje, či mírně klesá, i když předpoklad pro permeaci zněl, čím delší doba, tím více částic membránou prostoupí. K vysvětlení tohoto jevu lze formulovat několik hypotéz. Po delší době se nanočástice mohly začít shlukovat a vytvářet tak shluky o větší velikosti, také se mohly naadherovat na stěny permeačních cel či vialek, čímž nebyly dostupné při měření spektrofotometrem. Další možností je, že shluky nanočástic ucpaly póry membrány a zhoršily tak celkově podmínky pro průnik dalších nanočástic. Objasnění dějů, ke kterým v této situaci dochází, bylo již nad rámec této diplomové práce.

6.7 Pozorování vzorků z permeačního experimentu pomocí fluorescenční mikroskopie

Pro pozorování pomocí fluorescenčního mikroskopu byl vždy vybrán jeden vzorek od každého typu zkoumané membrány. U každého vybraného vzorku byly připraveny preparáty jak z akceptorové fáze, tak ze samotné membrány, a to po 24 hodinách permeace.

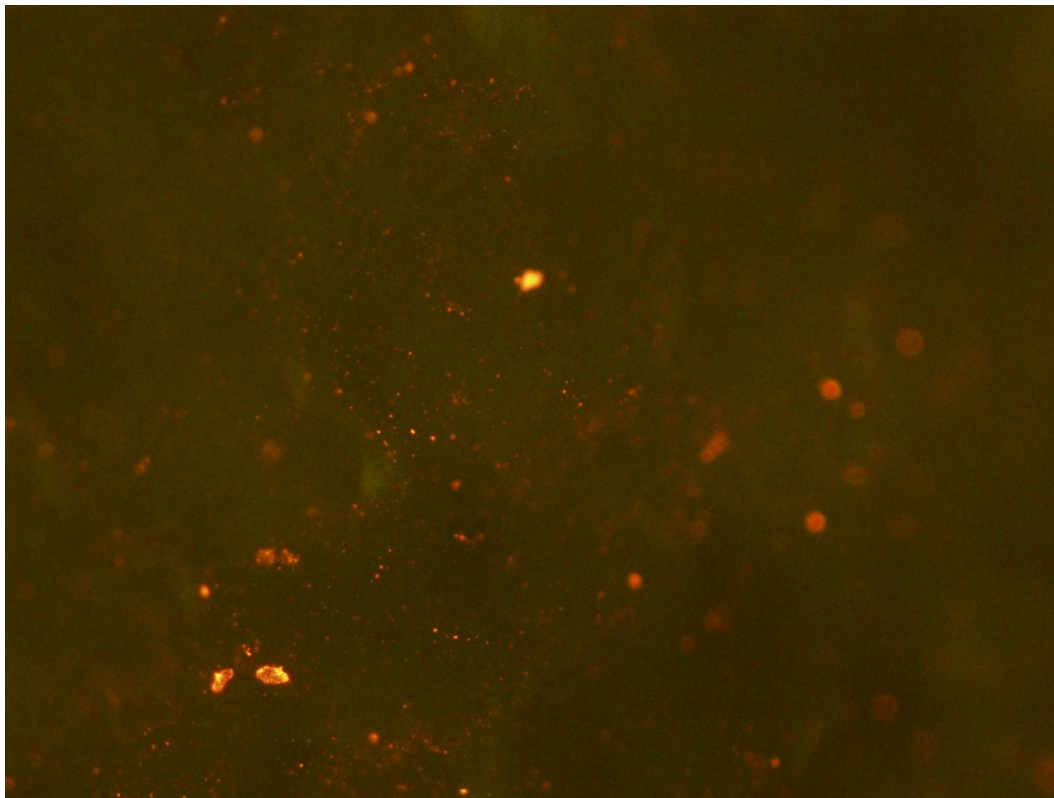
Pro čerstvou membránu zakonzervovanou azidem sodným byl vybrán vzorek č. 7. Pro čerstvou membránu zakonzervovanou azidem sodným a na hodinu zmraženou byl vybrán vzorek č. 13.

Preparáty byly připraveny postupem uvedeným v **kapitole 4.12** a pozorovány při různém nastavení fluorescenčního mikroskopu a při různých zvětšeních, což zachycují následující obrázky.

Jelikož celkový obsah nanočástic prošlých do akceptorové fáze byl velmi malý, u vzorku č. 7 nebyla při pozorování ve fluorescenčním mikroskopu nalezena v akceptorové fázi žádná nanočástice, i když bylo z tohoto vzorku připraveno několik preparátů. Důvodem bylo zřejmě zejména velmi malé množství vzorku používané k přípravě preparátu (cca 50 μ l) v kombinaci s nízkým množstvím nanočástic, které pronikly do akceptorové fáze.

- Čerstvá membrána zakonzervovaná azidem sodným

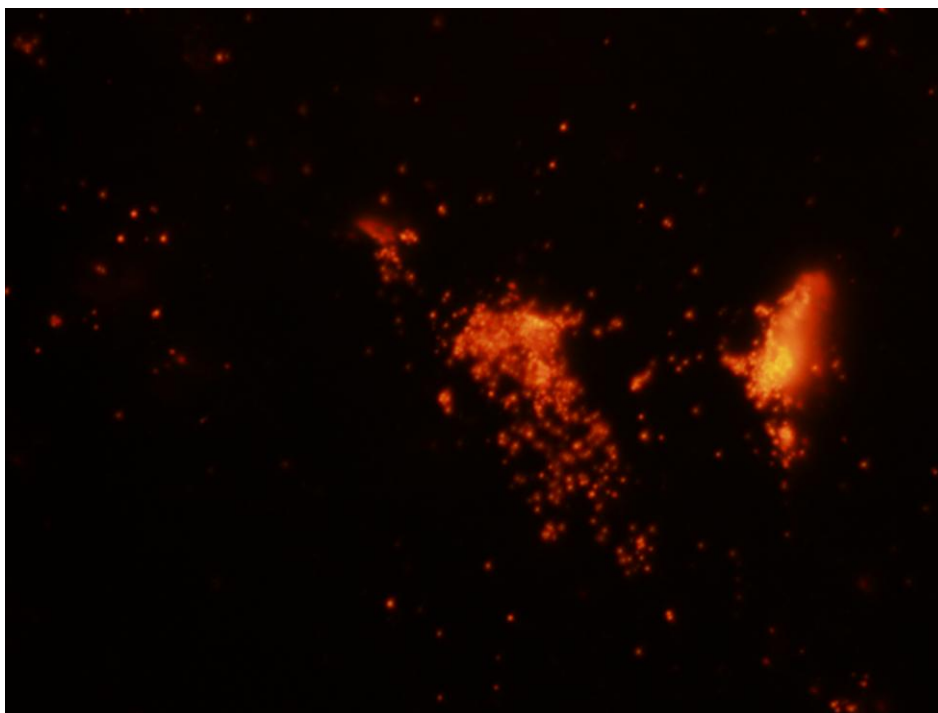
Obrázek č. 19: Vzorek č.7 – Membrána, WIB, ISO 200, 50 ms, zvětšení 100x, zapnutý zdroj VIS



Z **obrázku č. 19** je patrné, že nanočástice jsou prostoupeny v reliéfu membrány v různé hloubce. Na fotografii nejsou všechna místa stejně ostrá, proostřováním pak vystupují nanočástice v různé míře podle toho, v jaké vrstvě membrány se nacházejí.

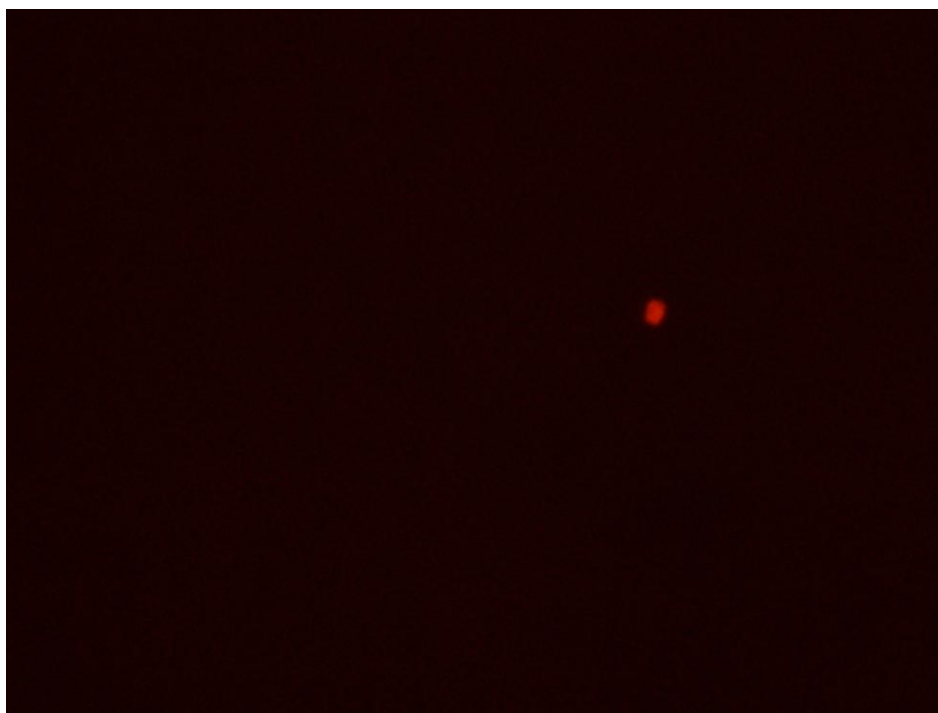
Při větším zvětšení zaniká možnost vidět reliéf membrány, jejíž vrstvy jsou naznačeny pouze nanočásticemi vystupujícími při zaostřování. Toto zvětšení umožňuje lépe pozorovat konkrétní shluky nanočástic či samotné nanočástice, jak je vidět na **obrázku č. 20**.

Obrázek č. 20: Vzorek č. 7 – *Membrána, WIB, ISO 200, 100 ms, zvětšení 1000x, imerzní olej*



- Čerstvá membrána zakonzervovaná azidem sodným a na hodinu zmražena

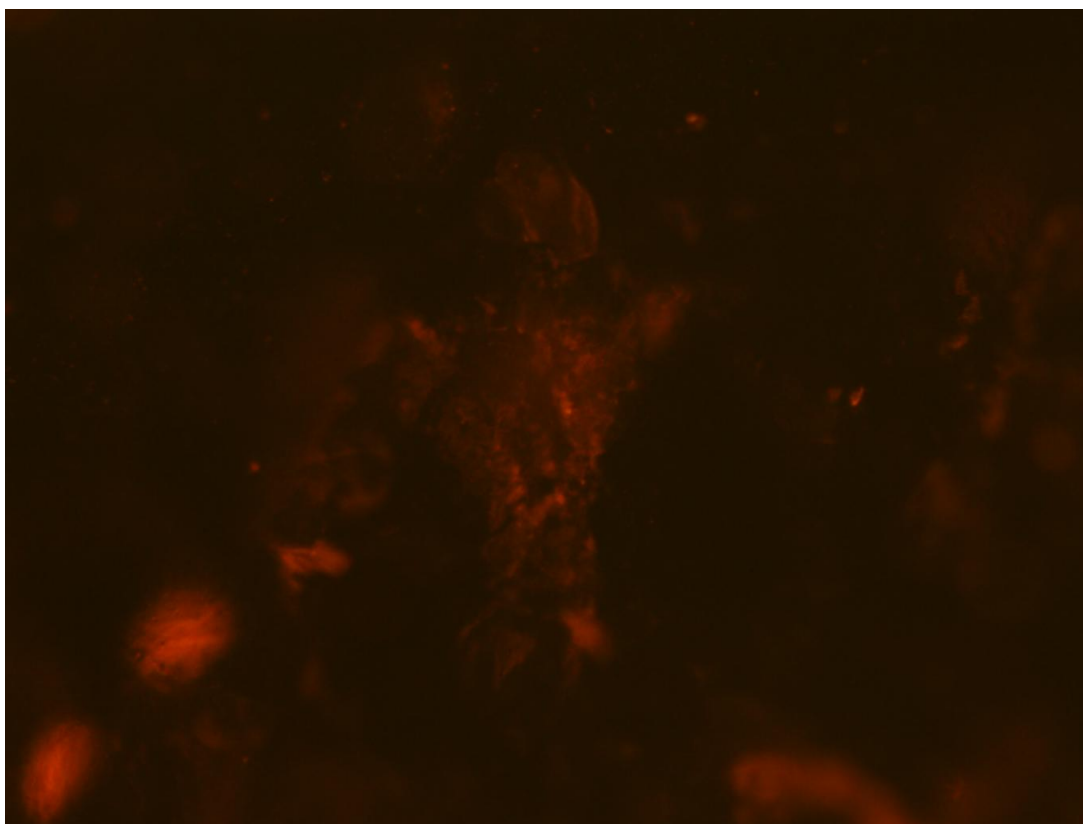
Obrázek č. 21: Vzorek č.13 – *akceptorová fáze, WIB, ISO 800, 30ms*



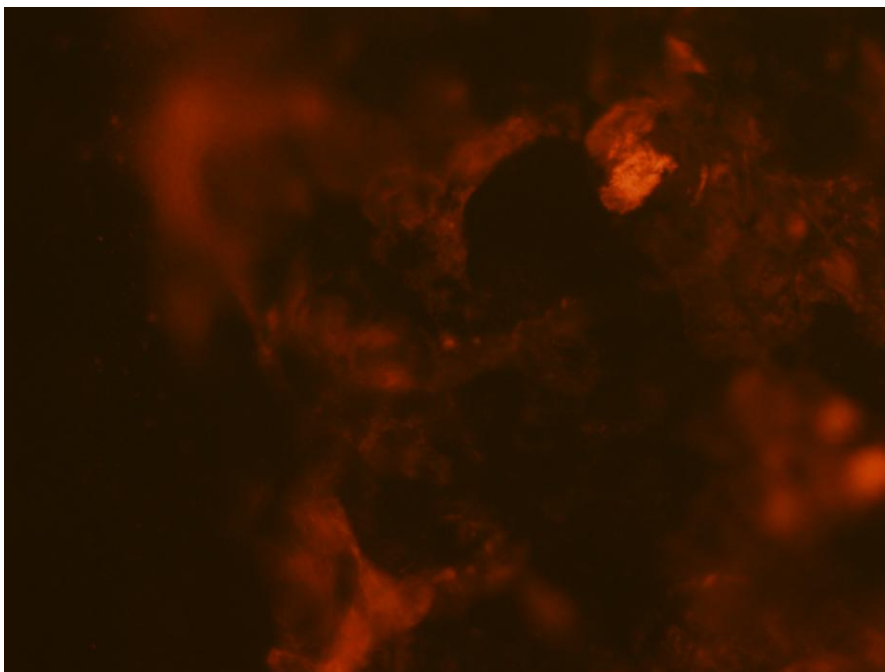
Obrázek č. 21 nám jasně ukazuje rozdíl mezi preparátem membrány a preparátem vyhotovených z akceptorové fáze. Z pěti připravených preparátů byl, pomocí fluorescenčního mikroskopu, v akceptorové fázi zachycen pouze jeden shluk nanočástic.

Další obrázky pak představují membrány s naadsorbovanými nanočásticemi při různých zvětšeních a různém nastavení mikroskopu.

Obrázek č. 22: Vzorek č. 13 – *Membrána, WIB, ISO 200, 100ms, zvětšení 200x*

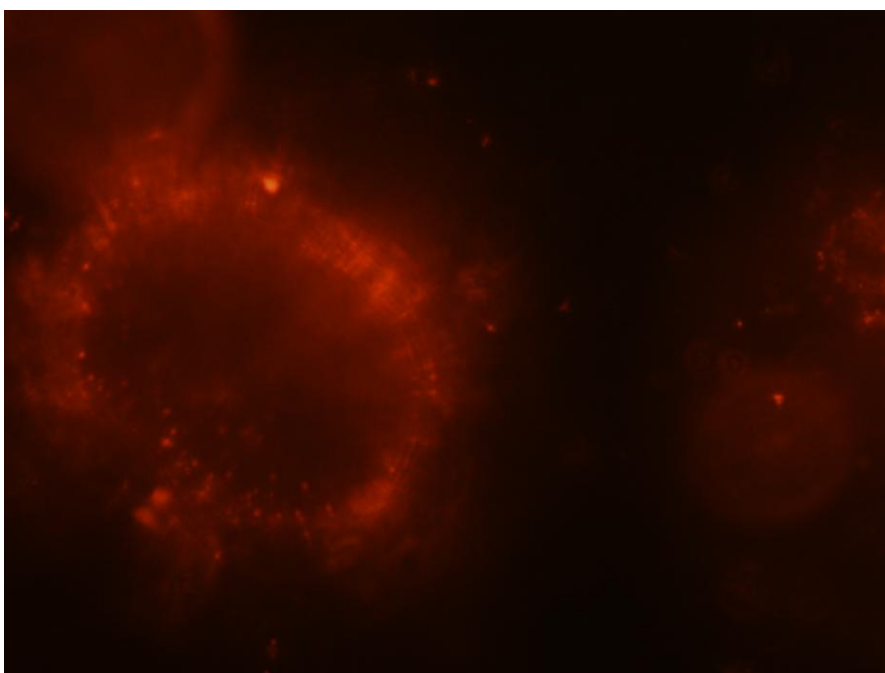


Obrázek č. 23: Vzorek č. 13 – *Membrána, WIB, ISO 200, 50ms, zvětšení 200x*



U **obrázků č. 22** a **23** bylo použito ještě poměrně malé zvětšení, kdy nanočástice představují různé obrazce podle toho, jak se uchytily v membráně při jejich průniku. Nelze zde rozlišit jednotlivé nanočástice. Větší zvětšení mikroskopu umožňuje lepší rozlišení jednotlivých nanočástic i v jejich shlucích, jak je vidět na **obrázku č. 24**.

Obrázek č. 24: Vzorek č. 13 – *Membrána, WIB ISO 200, 50ms, zvětšení 1000x, imerzní olej*



7 ZÁVĚRY

1. Metodou DLS byly ve třech různých médiích zjištěny následující průměrné hodnoty velikosti nanočástic:

Aqua pro injectione: Z-average: **169,3 nm ± 0,7 nm**; PDI: **0,223 ± 0,011**

Pufr pH 6,6: Z-average: **167,9 nm ± 1,3 nm**; PDI: **0,234 ± 0,024**

Pufr pH 7,4: Z-average: **169,7 nm ± 1,8 nm**; PDI: **0,235 ± 0,012**

Jednotlivá media mají jen nepatrný vliv na hodnotu velikosti nanočástic v disperzi.

2. Použité nanočástice bylo možno pozorovat pomocí fluorescenční mikroskopie, při vhodném zvětšení i jednotlivě. Při pozorování preparátů sublingválních membrán bylo možné rozlišit nanočástice prostoupené v různých vrstvách membrány.

3. V permeačním experimentu byla zjištěna procentuální část množství nanočástic, které pronikly z donorové fáze sublingvální membránou (1cm²) do akceptorové fáze po 24 hodinách permeace v jednotlivých vzorcích. Množství nanočástic v donorové fázi činilo 500 µg (100 µl 0,5% disperze).

- Čerstvá membrána zakonzervovaná azidem sodným

Vzorek č. 7 – **0,26 %**

Vzorek č. 8 – **0,34 %**

Vzorek č. 9 – **0,32 %** Průměr: **0,34 %**

Vzorek č. 10 – **0,32 %** SD: **0,06 %**

Vzorek č. 11 – **0,42 %**

Vzorek č. 12 – **0,38 %**

- Čerstvá membrána zakonzervovaná azidem sodným a na hodinu zmrazena

Vzorek č. 13 – **0,40 %**

Vzorek č. 14 – **0,42 %**

Vzorek č. 15 – **0,44 %** Průměr: **0,45 %**

Vzorek č. 16 – **0,36 %** SD: **0,09 %**

Vzorek č. 17 – **0,48 %**

Vzorek č. 18 – **0,62 %**

4. Z předchozího bodu vyplývá, že se podařilo prokázat prostup nanočástic sublingvální membránou. Z průběhu permeace se zdá, že pŕnik nanočástic cca po 18 hodinách stagnuje, či mírně klesá. Důvodem může být shlukování částic, adherence nanočástic na stěny permeačních stěn či vialek, nebo ucpání pŕů membrány shluklými nanočásticemi. Použití ředěných vzŕků by mohlo potvrdit či vyvrátit tuto hypotézu a získat další informace o chování nanočástic a průběhu permeace.

5. Prŕnik nanočástic přes membránu, která byla zmražena, byl nepatrně vyšší než přes nezmraženou membránu. Tento rozdíl by mohl být zvýrazněn např. při dlouhodobějším zmražení. Zmražení by mohlo mít určitý vliv na strukturu membrány, která by se pak stala propustnější.

6. V diplomové práci Pavlíny Dvořákové bylo zjištěno množství nanočástic, které pronikly sublingvální membránou (1cm²) do akceptorové fáze po 24 hodinách permeace z donorové fáze. Množství nanočástic v donorové fázi činilo 500 µg (0,5 % suspenze) u neředěných vzŕků a 100 µg u ředěných vzŕků.

- Membrána dlouhodobě zmražená (Permeace 1)

Vzorek č. 1 neředěný – **0,72%**

Vzorek č. 3 neředěný – **0,66%**

Vzorek č. 4 ředěný (1:4) – **1,40%**

Vzorek č. 6 ředěný (1:4) – **1,60%**

- Čerstvá membrána ve fyziologickém roztoku (Permeace 2)

Vzorek č. 1 neředěný – **0,32 %**

Vzorek č. 2 neředěný – **0,32 %**

Vzorek č. 3 neředěný – **0,36 %**

Vzorek č. 4 neředěný – **0,30 %**

Vzorek č. 5 neředěný – **0,30 %**

Vzorek č. 6 neředěný – **0,40 %**

Prŕměr: **0,33 %**

SD: **0,04 %**

7. Průnik nanočástic se lišil v závislosti na způsobu úpravy membrány. Z těchto pilotních pokusů se zdá, že nejlépe pronikaly nanočástice dlouhodobě zmraženou membránou, pak následovala membrána zakonzervovaná azidem sodným a na hodinu zmražená, dále membrána zakonzervovaná azidem sodným (nezmražená) a nejhůře pronikaly nanočástice čerstvou membránou ponořenou ve fyziologickém roztoku bez konzervačních přísad. Tím se také potvrzuje vliv délky doby zmražení na propustnost membrány.

Z výsledků, které zpracovala Pavlína Dvořáková, také vyplývá, že nanočástice procházejí membránou relativně lépe ze zředěných vzorků, což podporuje hypotézu o ucpání pórů v membráně neředěnými vzorky.

8. Bylo by vhodné provést další měření, které by byly orientovány na problematiku průniku nanočástic z různě ředěných donorů různě upravenými membránami s větším počtem vzorků, aby množství získaných dat bylo dostačující pro statistické zpracování.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AFM	mikroskopie atomárních sil
AH	kyselina
[AH]/[A⁻]	koncentrace nedisociované/disociované formy (kyselina)
Au	chemická značka zlata
B	baze
[BH⁺]/[B]	koncentrace disociované/nedisociované formy (baze)
C_k [mg/100ml]	korigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
C_{nk} [mg/100ml]	nekorigovaná koncentrace permeantu v akceptorové fázi
ČL 2009	Český lékopis 2009
D [m²/s]	difuzní koeficient
d [m]	hydrodynamický průměr
Da	Dalton, atomová hmotnostní jednotka
DLS	dynamický rozptyl světla
DSC	Dispersion Technology Software (Malvern, UK)
EmL/Ref	Emmission left/Reference – nastavení luminiscenčního spektrometru - Aminco-Browman [®] Series 2
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ISO	citlivost senzoru kamery na světlo – fluorescenční mikroskop
J [μg.cm⁻².h⁻¹]	flux nanočástic
J_r [μg.cm⁻².h⁻¹]	průměrná hodnota fluxů nanočástic
K_a	disociační konstanta
k_B [1,3807 x 10⁻²³ J/K]	Boltzmannova konstanta
LD	laserová difrakce
MCGs	membrane coating granules – membránové granule
MS	hmotnostní spektroskopie
M_r [g/mol]	molekulová hmotnost
n	počet naměřených bodů (protokoly)
η [Pa.s]	viskozita
NK/K	nekeratinizovaná/keratinizovaná tkáň

P/logP	rozdělovací koeficient/logaritmická forma rozdělovacího koeficientu
P1	první série měření
P2	druhá série měření
PCS	fotonkorelační spektroskopie (synonymum DLS)
PDI	index polydisperzity
PEG	polyethylenglykol
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
q	absolutní člen
Q_d [μg]	množství permeantu v donorové fázi
QELS	kvazielastický rozptyl světla (synonymum DLS)
Q_t [μg]	množství permeantu prošlého sublingvální membránou
Q_t [μg/cm²]	množství permeantu prošlého přes 1cm ² sublingvální membrány
R [%]	procentuální část permeantu, který prošel membránou, z jeho celkového množství v donorové fázi
r	korelační koeficient
R_h [m]	hydrodynamický poloměr
SD	směrodatná odchylka
SEM	rastrová elektronová mikroskopie
T [K]	teplota
t [h]	čas
TEM	transmisní elektronový mikroskop
V_o[ml]	celkové množství akceptorového media
ΔV_{dop} [ml]	množství doplňovaného akceptorového media
WIB	filtr pro excitaci modrým světlem (460 – 490 nm) – fluorescenční mikroskop
XRD	rentgenová difrakce
ZP [V]	zeta potenciál
σ_J	směrodatná odchylka hodnot fluxů

9 ZDROJE

1. Navrátil, V. *Rozvoj nanotechnologií a lidské zdraví*. School and Health 21. Současný diskurs zkoumání školy a zdraví [online] **2008**, p. 157-159.
http://www.ped.muni.cz/z21/knihy/2008/25/25/texty/cze/navratil_cz.pdf (accessed Nov 13, 2011)
2. Řezanka, P.; Záruba, K.; Král, V. *Potenciál modifikovaných nanočástic v analytické chemii*. Chemické listy. **2007**, 11, p. 881.
3. Klusoň, P.; Drobek, M.; Bartková, H.; Budil, I. *Vítejte v „nanosvětě“*. Chemické listy. **2007**, 04, p. 264-270.
4. Zhang, H.; Zhang, J.; Streisand, J., B. *Oral Mucosal Drug Delivery: Clinical Pharmacokinetics and Therapeutic Applications*. Drug Delivery Systems. **2002**, 41(9), p. 662.
5. Hearnden, V.; Sankar, V.; Hull, K.; Juras D., V.; Greenberg, M.; Kerr, A., R.; Lockhart, P., B.; Patton, L., L.; Porter, S.; Thornhill, M., H. *New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease*. Advanced Drug Delivery Reviews. **2011**, p. 13.
6. Čihák, R.; Grim, M. *Anatomie 2*, 2nd ed.; Grada Publishing, spol. s.r.o: Praha, 2002, pp. 10-46
7. Patel, V., F.; Liu, F.; Brown, M., B. *Advances in oral transmucosal drug delivery*. Journal of Controlled Release. **2011**, 153, p. 106.
8. Kuna, M.; *Mucoadhezivní tablety*. Praktické lékařství. **2008**, 7, 242.
9. Klepáček, I.; Mazánek, J.; Eber, M.; Fiala, P.; Kočová, J.; Mrázková, O.; Páč, L. *Klinická anatomie ve stomatologii*, Grada Publishing, spol. s.r.o: Praha, 2001, pp. 134-135

10. Jirkovská, M.; Ústní dutina, stavba sliznice, zvláštnosti topografických oblastí ústní dutiny, gingiva [online], Univerzita Karlova, Praha, CZ, 2011.
<http://uhiem.raycz.cz/cz/frames.htm> (accessed Nov 7, 2011)
11. Sohi, H.; Ahuja, A.; Ahmad, F., J.; Khar, R., K. *Critical evaluation of permeation enhancers for oral mucosal drug delivery*. Drug Development and Industrial Pharmacy. **2010**, 36(3), p. 254.
12. Rathbone, M., J.; Drummond, B. K.; Tucker, I., G. *The oral cavity as a site for systemic drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews. **1994**, 13, p. 1.
13. Stevens, A.; Lowe, S., J. *Human Histology*, 3rd ed.; Elviesier Mosby: Philadelphia, USA, 2005, pp. 191-192
14. Lincová, D.; Farghali, H.; *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2nd ed.; Galén: Praha, 2007, pp. 6-8
15. Martínková, J.; Chládek, J.; Mičuda, S.; Cermanová J.; Grim, J. *Obecná farmakologie*, vyd. Olgy Čermákové: Hradec Králové, 2001, pp. 15-18
16. Endocytosis: Pinocytosis. SJCABiology [online] 2001.
http://sjcabiology.wikispaces.com/file/view/Biology_Chapter_5_Wiki_Project_Endocytosis_PINOCYTOSIS.jpg (accessed Dec 4, 2011)
17. Berlin, Ch., M.; May-McCarver, D., G.; Notterman, D., A.; Ward, R., M.; Weismann, D., N.; Wilson, G., S.; Wilson, J., T. *Alternative Routes of Drug Administration-Advantages and Disadvantages*, Pediatrics. **1997**, 100, p. 142.
18. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.; *Barevný atlas farmakologie*, 5th ed.; Grada Publishing, spol. s.r.o: Praha, 2006, pp. 18-26

19. Mathias, N., R.; Hussain, M., A. *Non-invasive systemic drug delivery: developability considerations for alternate routes of administration*, Journal of Pharmaceutical Sciences. **2010**, 99(1), p. 1.
20. Rathbone, M., J.; Drummond, B. K.; Tucker, I., G. *The oral cavity as a site for systemic drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews. **1994**, 13, p. 1.
21. Lai, S., K.; Wang, Y.; Hanes, J. *Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues*. Advanced Drug Delivery Reviews. **2009**, 61, p. 158.
22. Sanvicens, N.; Marco, M., P. *Multifunctional nanoparticles –properties and prospects for their use in human medicine*. Trends in Biotechnology. **2008**, 26, p. 425.
23. Parveen, S.; Misra, R.; Sahoo, S., K. *Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging*, Nanomedicine. **2011**, p. 1.
24. Wu, L.; Zhang, J.; Watanabe, W. *Physical and chemical stability of drug nanoparticles*. Advanced Drug Delivery Reviews. **2011**, 63, p. 456
25. Chalabala, M.; Komárek, P.; Kopecký, F.; Vitková, M.; Rabišková, M.; Mužík, M.; Řehula, M.; Kopecká, B.; Janoušek, M.; Pešák, M.; Wirth, Z.; Šolc, J.; Gleich, S.; Šrámek, D. *Technologie léků*, 3 rd ed.; Galén: Praha, 2006, pp. 164
26. Šrámek, J.; *Nanotechnologie v medicíně* [online] Masarykova univerzita, Brno, CZ, 2009. <http://www.med.muni.cz/~formol/doc/nanotech.pdf> (accessed Dec 4, 2011)
27. Nano beads based on PD, Chromeon 470-marked. Sigma-Aldrich. [online] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/43187?lang=en®ion=CZ> (accessed Apr 29, 2011)
28. PD-ChromeoTM Nanoparticles. Active Motif. [online] http://www.chromeon.de/catalog/nanoparticles/pd_nano (accessed Apr 29, 2011)

29. Fluorimetrie. Wikiskripta. [online]
<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Fluorimetrie> (accessed Nov 12, 2011)
30. Štern, P.; Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii [online], Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha, 2000.
<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm> (accessed Nov 12, 2011)
31. Fährnrich, J.; Fluorimetrie [online], Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, CZ, 2011. <http://www.vscht.cz/anl/lach2/FLUORO.pdf> (accessed Nov 12, 2011)
32. Černý, J.; Fluorescenční mikroskopie [online], Univerzita Karlova, Praha, CZ, 2005.
<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/3cerny.pdf>
(accessed Nov 13, 2011)
33. Hofr, C.; Fluorescenční mikroskopie [online], Masarykova univerzita, Brno, CZ, 2007.
http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi7230/um/3973768/12_mikroskopie.pdf
(accessed Nov 13, 2011)
34. Fluorescence. Mikroskopy. [online] <http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence/> (accessed Nov 13, 2011)
35. Anatomy of the Fluorescence Microscope. Olympus-Microscopy Resource center. [online]
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy.html> (accessed May 4, 2012)
36. Mikroskopická technika: Fluorescenční mikroskopie. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy.
<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescenci.htm>
(accessed Nov 13, 2011)

37. Weigl, E.; Raška, M.Ph.D.; Šíma, P.; Turánek, J.; Frömmel, J.; Raskova Kafkova, L.; Studijní texty k teoretickým modulům [online], Škola molekulárních biotechnologií Profession, Olomouc, CZ, 2010, 119-131 http://www.skola-profession.cz/smb_profession_teorie.pdf (accessed Nov 12, 2011)
38. Zetasizer Nano ZS. Malvern.
http://www.malvern.com/labeng/products/zetasizer/zetasizer_nano/zetasizer_nano_zs.htm (accessed Nov 12, 2011)
39. Dynamic light scattering (DLS). Malvern.
http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm (accessed Nov 12, 2011)
40. Dynamic Light Scattering Instrumentation for classical 90 degree scattering measurements. Malvern.
http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/classical_90_degree_scattering.htm (accessed Nov 12, 2011)
41. New dynamic light scattering technology for high sensitivity and measurement at high concentration (NIBS). Malvern.
http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/nibs.htm (accessed May 3, 2012)
42. Dvořáková, P.: Průnik nanočástic (Chromeon 470) sublingvální membránou. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie, Vedoucí práce: Mgr. Pavel Berka, Hradec Králové, CZ, 2012
43. Janečka, J.: Sublinguální aplikace léčiv 6. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie, Vedoucí práce: Doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc., Hradec Králové, CZ, 2012

44. Klemra, P.; Doležal, P.; Berka, P.; Svozil, M.: Šablona pro zpracování výsledků permeačních pokusů. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, CZ, 2012.
45. Trojan, S.; Langmeier, M.; Hrachovina, V.; Kittnar, O.; Koudelová, J.; Kuthan, V.; Mareš, J.; Marešová, D.; Mourek, J.; Pokorný, J.; Sedláček, J.; Schreiber, M.; Trávníčková, E.; Wunsch, Z. *Lékařská fyziologie*, 4th ed.; Grada Publishing, spol. s.r.o: Praha, 2003, pp. 116